

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Podozyten-spezifischer
Murine Double Minute (MDM) 2 Knockout
führt zu fokal segmentaler Glomerulosklerose**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hauke Arne Bruns

aus Bremen

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans Joachim Anders
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Michael Staehler
Priv. Doz. Dr. Bärbel Lange-Sperandio
Prof. Dr. Walter Hofmann

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Dana Thomasova, PhD

Dekan : Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2017

Eidesstattliche Versicherung

von Hauke Arne Bruns

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Podozyten-spezifischer Murine Double Minute (MDM) 2 Knockout führt zu
fokal segmentaler Glomerulosklerose**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Folgende Personen haben an der Durchführung dieser Arbeit mitgewirkt:

- Dr. Dana Thomasova, PhD, LMU München
Sie fertigte Aufnahmen der immunhistologischen Schnitte an.
- Prof. Dr. Helen Liapis, Washington University, USA
Sie fertigte die elektronenmikroskopischen Aufnahmen an.
- Janina Mandelbaum und Dan Draganovici, LMU München
Sie fertigten die histologischen Schnitte an und führten die Genotypisierung der Versuchstiere durch.

München, 26.01.2017

Hauke Arne Bruns

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Februar 2012 und August 2013 im Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Hans Joachim Anders betreut.

Förderung des Projekts:

Diese Arbeit wurde durch das Förderprogramm Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität unter Leitung von Prof. Dr. Jürgen Heesemann gefördert.

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:

Publikationen:

Thomasova, D., Bruns, H., Kretschmer, V., Ebrahim, M., Romoli, S., Liapis, H., Kotb, A. M., Endlich, N. und Anders, H.-J.: Murine Double Minute-2 Prevents p53-Overactivation-Related Cell Death (Podoptosis) of Podocytes. J. Am. Soc. Nephrol. 2015, 26(7): 1513-1523.

Poster:

Jahrestagung der DGfN 2013, Berlin. Thomasova, D., Bruns, H., Kretschmer, V., Liapis, H. und Anders, H.-J. Podozyten-spezifischer MDM-2 Mangel führt zu fokal segmentaler Glomerulosklerose.

Kongress ERA-EDTA 2013, Istanbul. Thomasova, D., Bruns H., Liapis, H., und Anders, H.-J.: Lack of Murine Double Minute (MDM)-2 in Podocytes causes Autophagic Cell Death and FSGS.

Kongress DGIM 2013, Wiesbaden. Bruns, H., Thomasova, D., Liapis, H. und Anders, H.-J. MDM2 Mangel in Podozyten führt zu gestörter Autophagie und fokal-segmentaler Glomerulosklerose.

Vortrag:

Berichtskolloquium des Förderprogramms Forschung & Lehre 2013, Herrsching: Bruns, H., Thomasova, D., Anders H.-J.: Podozyten-spezifischer MDM2-Mangel führt zu fokal-segmentaler Glomerulosklerose.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Chronische Nierenerkrankung und Glomerulosklerose	7
1.1.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD)	7
1.1.2 Glomerulosklerose	9
1.1.3 Chronische Nierenerkrankung und Podozytenverlust	12
1.2 Podozyten	13
1.2.1 Morphologie der Podozyten	13
1.2.2 Funktion der Podozyten	15
1.2.3 Besonderheiten der Podozyten	16
1.2.4 Podozyten in Zellkultur	17
1.3 Die glomeruläre Filtrationsbarriere	18
1.3.1 Das fenestrierte Endothel	19
1.3.2 Die glomeruläre Basalmembran	19
1.3.3 Die Schlitzmembran	20
1.4 Der Zellzyklus-Regulator p53	21
1.4.1 Das Molekül p53	21
1.4.2 Wirkung von p53	21
1.5 Der p53-Inhibitor MDM2	23
1.5.1 Das Molekül MDM2	23
1.5.2 Interaktion zwischen MDM2 und p53	24
1.5.3 MDM2: Klinische Relevanz	24
1.5.4 MDM2 und Tumorthherapie	27
1.5.5 MDM2 in der Niere	29
1.6 Hypothese	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.1.1 Geräte	32
2.1.2 Materialien für Tierexperimente	33
2.1.3 Materialien für molekularbiologische Methoden	35
2.1.4 Materialien für immunologische Methoden	36
2.1.5 Materialien für histologische Methoden	37
2.1.6 Materialien für in vitro Methoden	39
2.2 Tierexperimente	40
2.2.1 Tierhaltung	40
2.2.2 Studiendesign	40
2.2.3 Herstellung der MDM2 Δ Podozyt Mäuse	40
2.2.4 Genotypisierung	41
2.2.5 Urinabnahme	43
2.2.6 Blutabnahme	44
2.2.7 Entnahme der Nieren	44
2.2.8 Isolation der Glomeruli	44

2.3 Molekularbiologische Methoden	46
2.3.1 RNA-Isolation	46
2.3.2 cDNA-Synthese	47
2.3.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	47
2.3.4 Protein-Isolation	48
2.4 Immunologische Methoden	49
2.4.1 Albumin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	49
2.4.2 Kreatinin-Messung	50
2.4.3 Western-Blot	51
2.5 Histologische Methoden	52
2.5.1 Histologische Schnitte	52
2.5.2 Färbungen	52
2.5.3 Elektronenmikroskopie	55
2.6 in vitro Methoden	56
2.6.1 Kultur der Podozyten-Zelllinie	56
2.6.2 Stimulation von Podozyten	56
2.6.3 Lactatdehydrogenase-Assay	57
2.7 Statistische Auswertung	58
3 Ergebnisse	59
3.1 Cre/loxP MDM2-Knockout vermindert MDM2-Expression in Podozyten	59
3.2 MDM2-Knockout führt zu erhöhter p53-Expression in Podozyten	62
3.3 MDM2-Knockout vermindert die Expression Podozyten-spezifischer Gene	63
3.4 MDM2-Knockout führt zu Podozytenverlust	64
3.5 Podozyten-spezifischer MDM2-Knockout führt zu Proteinurie	66
3.6 MDM2-KO-Mäuse entwickeln eine fokal-segmentale Glomerulosklerose	67
3.7 MDM2-Knockout führt zu keiner Änderung des Körpergewichtes	69
3.8 MDM2-Knockouts haben eine eingeschränkte Lebenserwartung	70
3.9 MDM2-Mangel bedingt ultrastrukturelle Auffälligkeiten der Podozyten	71
3.10 Trotz MDM2-Mangel erfolgt eine normale Entwicklung der Podozyten	72
3.11 Ergebnisse der in vitro Experimente	74
3.12 Zusammenfassung der Ergebnisse	77
4 Diskussion	78
4.1 Trotz MDM2-Knockout erfolgt eine regelrechte Anlage der Podozyten	80
4.2 MDM2-Knockout führt zum Untergang nicht-stimulierter Podozyten	82
4.3 MDM2-Antagonisten bergen Risiko der Podozytenschädigung	85
4.4 Methodische Limitationen	88
5 Zusammenfassung	89
6 Abkürzungsverzeichnis	90
7 Abbildungsverzeichnis	91
8 Tabellenverzeichnis	92
9 Bibliografie	93
10 Danksagung	105

1 Einleitung

1.1 Chronische Nierenerkrankung und Glomerulosklerose

1.1.1 Chronische Nierenerkrankung (CKD)

Als Chronische Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD) bezeichnet man eine Schädigung der Niere, die über einen längeren Zeitraum auftritt, und zu einer Beeinträchtigung der Gesundheit der Betroffenen führt [1]. Per Definition liegt eine strukturelle oder funktionelle Schädigung der Niere, die sich beispielsweise durch Proteinurie bemerkbar macht, oder eine eingeschränkte Nierenfunktion, die durch eine verringerte Glomerulären Filtrationsrate (GFR) von $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ charakterisiert wird, über einen Zeitraum von mindestens 3 Monaten vor [2]. CKD kann durch eine Vielzahl von Grunderkrankungen ausgelöst werden, die lediglich die chronische Schädigungen der Niere gemeinsam haben, und so im Laufe der Zeit progrediente Funktions-, bzw. Filtrationsstörungen nach sich ziehen [3]. Das pathologischen Korrelat der Filtrationsstörungen ist dabei in den meisten Fällen die Glomerulosklerose, die im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben wird [4].

Die bereits heute hohe Relevanz der chronischen Nierenerkrankung lässt sich hauptsächlich auf zwei Faktoren zurückführen: Erstens ist eine chronische Schädigung der Nieren, die eine lebensnotwendige Funktion ausüben, immer potentiell lebensbedrohlich. Zweitens sorgt die weltweit zunehmende Prävalenz für einen andauernden Anstieg der Fallzahlen [5]. Dabei lässt sich die zunehmende Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung klar mit der für den größten Teil der Menschen steigenden Lebenserwartung in Verbindung bringen, da besonders ältere Patienten ein erhöhtes Risiko für CKD aufweisen; während in den USA bei 20 - 39 Jährigen lediglich 4% an CKD leiden, beträgt die Rate bei den über 70 Jährigen $> 40\%$ (2004) [6]. Für Deutschland liegen Zahlen einer Studie des Robert-Koch Instituts aus den Jahren 2008 bis 2011 vor, die von Grindt et al. ausgewertet wurden [7]. Demnach weisen 2,3% der Bevölkerung im Alter zwischen 18 und 79 Jahren eine GFR von $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ auf, und erfüllen damit ein Hauptkriterium der CKD. Dabei kommt es auch hier zu einer heterogenen Verteilung der Inzidenz. Bei Probanden unter 50 Jahren traten GFR-Einschränkungen selten auf, während in der Altersgruppe von 70 bis 79 Jahren im Durchschnitt jeder 8. betroffen war. Geht man bei der Altersgruppe über 80 Jahren von einer vergleichbaren Inzidenz wie bei

den 70 bis 79jährigen aus, ergibt sich eine Zahl von über 2 Millionen Menschen, die in Deutschland mit einer eingeschränkten Nierenfunktion leben [7].

Aber nicht nur die zunehmende Alterung der Bevölkerung, sondern auch der weltweite Vormarsch von CKD-auslösende Grunderkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus oder arteriellem Hypertonus, tragen zu einer weiteren Größenzunahme der Population mit erhöhtem Risiko für CKD bei [8, 9]. Für die Zukunft bedeutet dies, dass die Patientenzahlen weiterhin ansteigen werden, und dass die Relevanz der chronischen Nierenerkrankung für Medizin und Gesellschaft damit ebenfalls weiter zunehmen wird [10]. Diese Entwicklung stellt bereits heute eine nicht zu unterschätzende Belastung für die Gesundheitssysteme dar. Schätzungen nach lagen die weltweiten kumulativen Kosten zur Behandlung der chronischen Nierenerkrankung und ihrer Folgen in den Jahren 2001 bis 2010 erstmals bei über 1 Billion US-Dollar [11]. Die steigende Prävalenz wird zu einem weiteren Anstieg dieser Summe führen, und somit die Gesundheitssysteme weltweit auch in Zukunft vor immense Herausforderungen stellen.

Die hohen Kosten der Therapie des chronischen Nierenversagens führen dazu, dass in Entwicklungs- und Schwellenländern mit finanziell schwach ausgestatteten Gesundheitssystemen Patienten aufgrund Mangels an finanziellen Mitteln nicht adäquat behandelt werden können. Da aber gerade in diesen Ländern die Lebenserwartung steigt, wächst dort der Anteil älterer Menschen, und damit die Gruppe mit erhöhtem Risiko für CKD, überproportional. Die bei GFR-Einschränkungen drastisch ansteigende Mortalität führt zu einer steigenden Anzahl an Todesfällen aufgrund chronischen Nierenerkrankungen [12]. Im Zeitraum von 1990 bis 2013 beispielsweise stieg die Zahl der jährlich durch CKD verursachten Todesfälle um 135%, auf weltweit über 950.000 im Jahr 2013, an [13]. Alleine diese Zahl belegt, wie wichtig es ist, die Entstehungsmechanismen der CKD weiter zu erforschen, und nach neuen Therapiemöglichkeiten zu suchen.

1.1.2 Glomerulosklerose

Eine chronische Nierenschädigung führt bei nahezu 90% der Patienten zu einer Schädigung der Glomeruli [3], wobei das pathologische Korrelat eine Sklerosierung der Gefäßschlingen ist, die als Glomerulosklerose bezeichnet wird und zu einem Verlust der glomerulären Funktion führt. Je nach Ausbreitungsmuster der Läsionen können die Adjektive fokal und segmental beschreiben, dass nicht alle Glomeruli der Niere betroffen sind, sondern die Veränderungen nur fokal auftreten, und die betroffenen Glomeruli nicht gleichmäßig befallen sind, sondern zunächst meist nur einzelne Segmente auffällig werden. Zum Verständnis der 1925 von Theodor Fahr erstmals beschriebenen histopathologischen Läsion der fokal segmentalen Glomerulosklerose hilft es, zunächst einmal die Anatomie des Glomerulus zu betrachten [14].

Der Glomerulus

Als Glomerulus (Abbildung 1) werden die Gefäßkonvolute mitsamt ihren stützenden Zellen und Extrazellulärmatrix bezeichnet, die geschützt von Bowman'schen Kapsel im Inneren der vorwiegend in der Nierenrinde vorkommenden Nierenkörperchen liegen. In jeder Niere finden sich etwa eine Million dieser Funktionseinheiten [15]. Zusammen stellen sie die Filtrationsbarriere zwischen Blut und Primärharn dar.

Die Blut aus den Nierenarterien zuführenden *Vasa afferentia* speisen innerhalb der Kapseln der Glomeruli stark gewundene, sich verzweigende Gefäßkonvolute. Da deren Endothel die innerste Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere darstellt, sorgen die

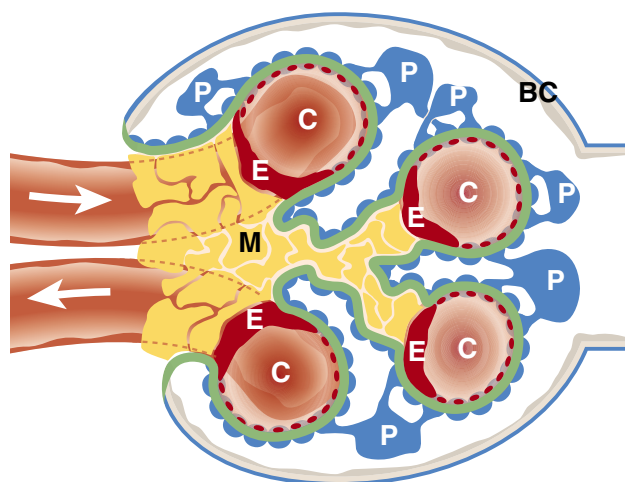


Abbildung 1, aus Quaggin et al. 2008: Glomerulus-Querschnitt, schematische Darstellung.
 BC: Bowman'sche Kapsel, C: Kapillarschlinge, E: Endothelzelle, M: Mesangialzelle, P: Podozyt.

zahlreichen Windungen dafür, dass das Blut während des Durchtritts eine größtmögliche Fläche an Gefäßendothel passiert. So wird die zur Filtration zur Verfügung stehende Fläche maximiert. Die Gefäßschlingen sind auf der dem Gefäßpol zugewandten Seite von dem intraglomerulären Mesangium umgeben. Die Funktion des aus extrazellulärer Matrix und eingelagerten Mesangiozyten bestehenden Gewebes ist es, die Struktur des Glomerulus zu erhalten und die glomerulären Kapillaren zu schützen und zu stabilisieren [16]. Neben Sekretion von widerstandsfähiger mesangialer Matrix können Mesangiozyten durch Kontraktion zur Stabilisierung von beispielsweise durch erhöhte intravasale Drücke belasteten Gefäßschlingen beitragen [17]. Kommt es im Laufe von Erkrankungen allerdings zu übermäßiger Proliferation der Mesangiozyten oder zu verstärkter Bildung von Extrazellulärmatrix, wird durch Druck auf die Kapillaren deren Durchmesser und damit die die zur Filtration zur Verfügung stehende Fläche erst verringert, bis es schließlich zum kompletten Verschluss der Gefäßschlingen kommen kann [18].

Die dem Harnpol zugewandten Seite der Gefäßschlingen bildet die eigentliche glomeruläre Filtrationsbarriere, die aus Endothel, Basalmembran und sich auflagernden Podozyten besteht [19]. Deren Aufbau, und die Besonderheiten der Podozyten, sind in den zugehörigen Abschnitten ausführlich beschrieben. Das parietale Blatt der Bowman'schen Kapsel, das aus parietalen Epithelzellen, die ein einfaches Plattenepithel formen, mit dazugehöriger Basalmembran besteht, umschließt das Gefäßknäuel des Nierenkörperchens [20]. Zwischen den auf der glomerulären Basalmembran sitzenden Podozyten, und dem parietalen Blatt, liegt der Bowman'sche Kapselraum. In diesen gelangt der Primärharn nach Durchtreten der glomerulären Filtrationsbarriere, von wo aus er in den tubulären Teil des Nephrons, und schließlich in die ableitenden Harnwege, gelangt.

Pathogenese der Glomerulosklerose

Der Verlust von Podozyten wird als entscheidend bei der Entstehung der Glomerulosklerose angesehen [21, 22]. Durch schädigende Einflüsse auf die Podozyten kommt es in deren Fußfortsätzen zum Verlust der strukturellen Integrität der Aktinfilamente, sodass die Stabilität des Zytoskeletts verloren geht und es zur Ablösung der Fußfortsätze von der glomerulären Basalmembran kommt. Dabei sind die Arten der podozytären Schädigung äußerst vielfältig. Ein Beispiel sind physikalische Schädigungen aufgrund hypertoniebedingtem oder durch reaktive Hypertrophie ausgelösten Stress auf die Zellen [23, 24]. Aber auch metabolische Schädigungen aufgrund Diabetes Mellitus oder durch Infarkt-bedingte Minderperfusion spielen neben verschiedensten toxischen,

autoimmunen und infektiösen Noxen sowie durch physikalische Alterungsprozesse bedingten Schädigungen eine wichtige Rolle [24-27]. Haben alle Fortsätze eines Podozyten den Kontakt zur Basalmembran verloren, löst sich die Zelle in den Bowman'schen Kapselraum ab, wird über den Urin ausgeschieden, und es bleibt eine unbedeckte Fläche auf der glomerulären Basalmembran zurück. Zwischen dieser freien Flächen und dem parietalen Blatt der Bowman'schen Kapsel kann es zu nun zur Bildung von Synechien und Adhäsionen kommen [28], womit der Grundstein für weitere Sklerosierung gelegt wird.

Das Ausmaß des Podozytenverlustes ist entscheidend für den weiteren Verlauf der Glomerulosklerose. Geht nur eine geringe Anzahl an Podozyten verloren, können benachbarte Zellen den Verlust bis zu einem gewissen Grad durch Hypertrophie kompensieren, und der Glomerulus behält trotz Schädigung seine Struktur und Funktion [29-31]. Sobald aber eine größere Anzahl an Podozyten verloren geht, ist der damit einhergehende Struktur- und Funktionsverlust irreversibel [32, 33]. Die Schädigung des Glomeruli erfolgt dabei proportional zum Grad des Podozytenverlustes [34, 35]. Gehen weniger als 20% der Podozyten eines Glomerulus zugrunde, kommt es reaktiv lediglich zu mesangialer Hypertrophie, die aber durch Kompression der glomerulären Kapillaren bereits zu einer Abnahme der Filtrationsrate führen kann [24]. Ab einem Verlust von 20% der Zellen kommt es zur Entstehung von Synechien zwischen dem parietalen Blatt der Bowman'schen Kapsel und den von Fußfortsätzen unbedeckten Flächen, sowie zu einer meist temporärer Proteinurie. Verlust von 20-40% der Podozyten führt zu Vernarbungen einzelner Gefäßschleifen der betroffenen Glomeruli, was schließlich eine segmentale Sklerose darstellt. Ab diesem Stadium der Schädigung kommt es zu größtenteils irreversibler Proteinurie. 40-60% Verlust manifestiert sich in einer progredienten Sklerose, die ab 60% in eine globale Sklerose und damit einen Funktionsverlust des Glomerulus übergeht [22, 35]. Da die zu den sklerotisierten Glomeruli gehörigen Tubuli dadurch ebenfalls ohne Funktion sind, kommt es zum Ab- und fibrotischen Umbau der betroffenen Nierenareale, was zu Hyperplasie und dem makroskopischen Bild einer Schrumpfnieren führt.

1.1.3 Chronische Nierenerkrankung und Podozytenverlust

Der progrediente Verlust von Podozyten setzt einen *Circulus vitiosus* in Gang (Abbildung 2), der den Verlust weiterer Podozyten begünstigt, und ab einem gewissen Grad zu Sklerosierung und damit zum Ausfall der betroffenen Glomeruli führt. Um diesen Funktionsausfall zu kompensieren, kommt es daraufhin in den umliegenden Glomeruli zu Hyperfiltration. Diese reaktive Hyperfiltration stellt wiederum einen schädigenden Einfluss auf die Podozyten in den verbleibenden, nun überlasteten Glomeruli dar, der ebenfalls zum Verlust von Podozyten führen kann [36-38]. Die Folge ist, dass durch Podozytenverlust verursachte Erkrankungen mitsamt ihren Symptomen progredient sind, und zu chronischen Nierenschädigungen führen [39]. Podozyten nehmen somit eine entscheidende Rolle bei der Genese eines Großteils der chronischen Nierenerkrankungen ein [40].

Wie oben beschrieben, ist nur in Anfangsstadien des Podozytenverlustes die Proteinurie unter Umständen reversibel; später kann selbst unter Therapie lediglich das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt werden. Bei chronischen Nierenerkrankungen kommt es daher zu immer weiter abnehmender Nierenfunktion, sodass letztendlich ein chronisches Nierenversagen eintritt. Patienten mit Nierenversagen sind auf aufwendige, belastende und teure Therapien angewiesen, ohne die keine Überlebensfähigkeit besteht. Derzeit sind Nierenersatzverfahren (Dialyse), oder eine Nierentransplantation die einzigen Therapieoptionen, die bei dieser Erkrankung zu einer Verlängerung der Überlebenszeit führen [1].

Aus diesen Gründen können genaue Kenntnisse sowohl der physiologischen als auch der pathologischen Prozesse in den Podozyten, kombiniert mit Überwachung der

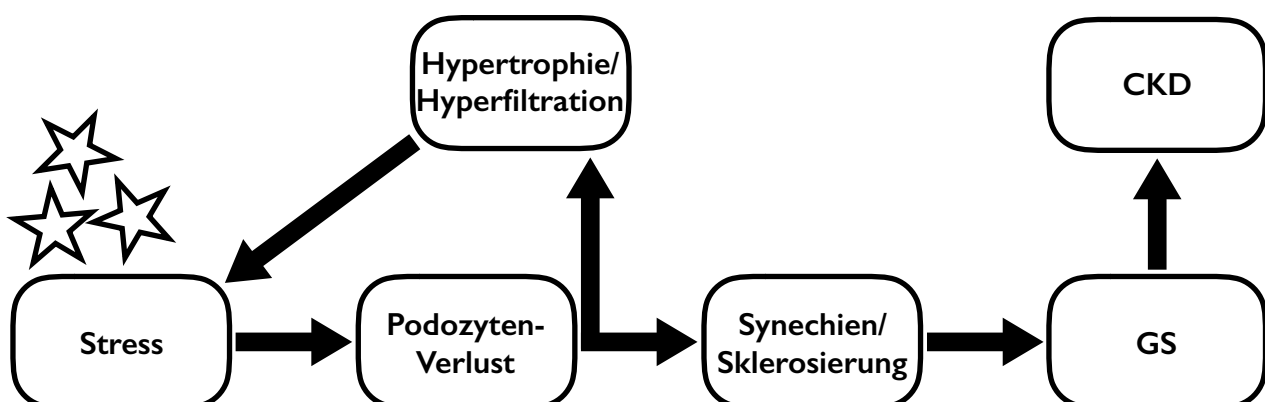


Abbildung 2: Podozytenverlust führt zu chronischer Nierenerkrankung. CKD: chronische Nierenerkrankung. GS: Glomerulosklerose.

Frühsymptomen der Podozytenschädigung, helfen, die Progression einer großen Zahl chronischer Nierenerkrankungen positiv zu beeinflussen. Dadurch kann sowohl ein positiver Einfluss auf die Lebensqualität der Patienten, als auch eine wirtschaftliche Entlastung von Gesundheitssystemen, erreicht werden.

1.2 Podozyten

Podozyten sind spezialisierte, differenzierte Epithelzellen, die den glomerulären Kapillaren auf der dem Harnpol zugewandten Seite des Glomerulus anliegen, und so das viszerale Blatt der Bowman'schen Kapsel bilden. Durch ihre Lage an der Blut-Harn-Schranke sind sie sowohl Einflüssen aus dem Blutkreislaufes als auch aus dem Harnsystems ausgesetzt, und tragen entscheidend zu der Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere bei [41]. Der wesentliche Unterschied zwischen dem Podozyten-Zellverband, und den meisten anderen Epithelien liegt darin, dass die Podozyten keinen Zellumsatz und eine fehlende Fähigkeit zur schnellen Regeneration aufweisen [42, 43]. Aufgrund des fehlenden Turnovers bergen Schädigungen von Podozyten die Gefahr einer progredienten Niereninsuffizienz, sodass Podozyten ein klinisch hochrelevantes Forschungsgebiet darstellen.

1.2.1 Morphologie der Podozyten

Sowohl morphologisch als auch zytoarchitektonisch lassen sich Podozyten in drei Segmente unterteilen: Zellkörper, primäre Fortsätze und sekundäre Fortsätze [44]. Einen schematischen Überblick bietet Abbildung 3.

Der Zellkörper

Der Zellkörper macht den größten Teil des Podozyten aus. Hier findet sich ein gemessen an dem Zellvolumen großer Nucleus mit prominentem Nucleolus. Ein großes endoplasmatisches Retikulum mit gut entwickelter Golgi-Apparat lassen sowohl auf hohe Proteinsynthese als auch auf ausgeprägte postranslationale Modifikation schließen. Die mechanische Stabilität des Podozyten wird im Zellkörper hauptsächlich durch die Intermediärfilamente Vimentin und Desmin gewährleistet. Es finden sich in geringen Maßen auch Mikrotubuli, die sowohl zur Stabilität beitragen als auch intrazelluläre Transportfunktionen übernehmen [45].

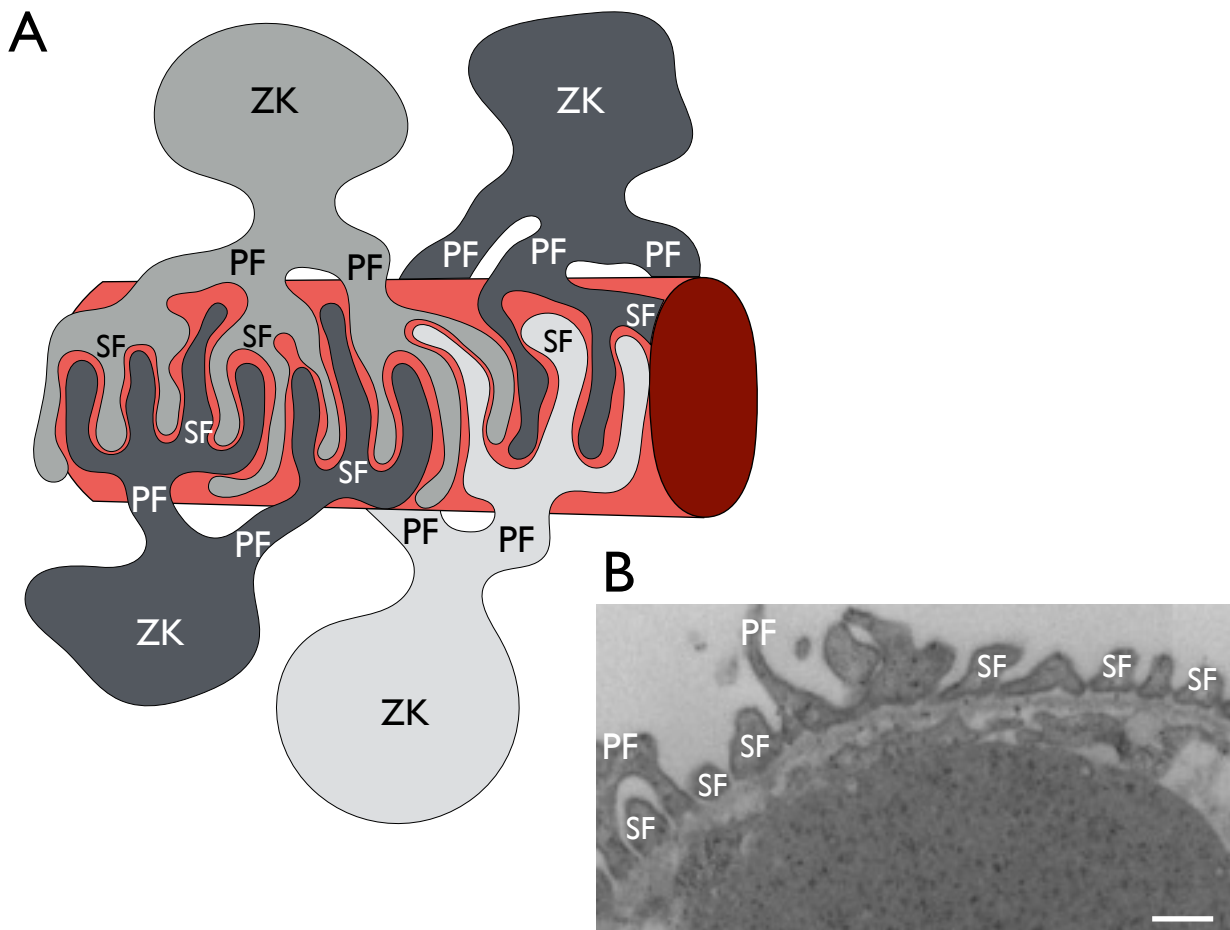


Abbildung 3: Podozyten-Morphologie. A: Vereinfachtes Schema von Podozyten mit ineinandergreifenden Fußfortsätzen. B: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Querschnitts nebeneinanderliegender Sekundärfortsätze. ZK: Zellkörper. PF: Primärfortsätze. SF: Sekundärfortsätze.

Die Primärfortsätze

Aus dem Zellkörper zweigen mehrere Primärfortsätze ab, die die Kapillaren mitsamt Basalmembran umgreifen. Ein Podozyt kann dabei in Kontakt mit mehreren Kapillaren stehen. Die Primärfortsätze unterscheiden sich sowohl zytoarchitektonisch als auch funktionell vom Zellkörper, der Aufgabenschwerpunkt verschiebt sich von der Proteinsynthese hin zum intrazellulären Proteintransport. Dies zeigt sich auch an dem im Vergleich zum Zellkörper stark vermindertem Vorkommen von Zellorganellen. Um der Aufgabe des Proteintransports gerecht zu werden, ist hier der Anteil der Mikrotubuli am Zytoskelett deutlich höher als im Zellkörper [45].

Die Sekundärfortsätze

Von den Primärfortsätzen zweigen zahllose Sekundärfortsätze ab, die auch Fußfortsätze (*foot processes*) genannt werden. Das Zytoskelett der Sekundärfortsätze wird von Mikrofilamenten wie Aktin und Myosin gebildet. Die kontraktionsfähigen Aktinfilamente

liegen hier in parallel angeordneten Bündeln vor, sodass sie bei Kontraktion synergistisch arbeiten [46]. Die Sekundärfortsätze benachbarter Podozyten greifen ineinander und ordnen sich reißverschlussartig an. Zwischen den einzelnen Fortsätzen bleibt ein nur ca. 30nm - 50nm breiter Spalt bestehen, der von der Schlitzmembran überspannt wird [47].

1.2.2 Funktion der Podozyten

Die Funktion der Podozyten ist es, die glomerulären Kapillaren zu stabilisieren und die Proteine der Schlitzmembran, sowie einen Großteil der extrazellulären Matrix (EZM) der Basalmembran, zu synthetisieren [24, 48]. Es ist unumstritten, dass die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere, deren detaillierter Aufbau in dem dazugehörigen Abschnitt beschrieben wird, ohne eine ausreichende Anzahl von intakten Podozyten mit primären und sekundären Fortsätzen nicht gewährleistet ist. Damit stellen die Fußfortsätze die eigentlich funktionell bedeutenden Strukturen der Podozyten dar. Die wesentliche Funktion des Zellkörpers der Podozyten ist es, neben der Synthese von Extrazellulärmatrix, ein Gerüst bzw. den Ursprung für die Fußfortsätze dar-, und die Versorgung derer sicherzustellen [41]. Die Fußfortsätze bilden den Rahmen für die äußerste und wichtigste Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB), die Schlitzmembran, die die letzte Barriere des aus dem Blut abgepressten Ultrafiltrats auf dem Weg in Richtung Bowman'schen Kapselraum darstellt [49], aus dem die Weiterleitung in den Tubulus erfolgt.

Es wird vermutet, dass durch Kontraktionen und die damit verbundenen Veränderungen der Sekundärfortsätze die Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere beeinflusst, und somit das Volumen und die Zusammensetzung des Primärfiltrats verändert werden kann [41]. Da diese Fähigkeit durch das Zytoskelett gewährleistet wird, haben Integritätsstörungen dessen direkte Auswirkungen auf die Morphologie der ineinander ragenden Fußfortsätze, und damit auch auf die Funktion der GFB. Die Folge einer solchen Strukturänderung der glomerulären Filtrationsbarriere kann somit von reversibler Proteinurie durch Strukturstörung der Schlitzmembran, bis hin zur vollständigen Ablösung der Fußfortsätze eines Podozyten reichen, was ein Verlust der Zelle bedeutet [50]. Ab einem gewissen Grad führt dieser Verlust zur Entstehung einer Glomerulosklerose [22, 35], was zu CKD und Niereninsuffizienz führen kann.

1.2.3 Besonderheiten der Podozyten

Bis vor einigen Jahren galt das wissenschaftliche Dogma, dass Podozytenproliferation bzw. -regeneration in der adulten Niere nicht stattfindet. Man ging davon aus, dass Podozyten nicht proliferieren, und die Niere nicht mit Vorläuferzellen ausgestattet ist, die die Fähigkeit haben, sich zu *de-novo* Podozyten zu differenzieren.

Diese Annahmen wurden jedoch widerlegt, als gezeigt werden konnte, dass es nach Podozytenverlust zur teilweisen Erholung der Zellpopulation kommen kann. Unter Gabe von ACE-Inhibitoren oder Kortikosteroiden, sowie bei einer konsequenten Diabetes-Einstellung, konnte eine teilweise Regeneration der Podozytenzahlen nachgewiesen werden [51-53]. Da dies allerdings ohne Anzeichen für Podozyten-Proliferation erfolgte, lag das Vorhandensein von renalen Podozyten-Vorläuferzellen nahe [54]. Im Rahmen von weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass parietale Epithelzellen (PECs) ein unerkanntes Potential zur Differenzierung zu Podozyten haben, und zur Regeneration von Podozyten beitragen können [54, 55]. Wanner et al. 2014 führten aus, dass dieser Mechanismus allerdings nicht bei Podozytenverlust aufgrund physiologischer Alterungsprozesse auftritt, sondern lediglich als Reaktion auf eine akute Schädigung oder im Rahmen von Wachstumsprozessen beobachtet werden kann [56]. Es zeigte sich, dass etwa 90% der Podozyten in einer adulten Niere embryonalen Ursprungs sind, während die übrigen 10% Marker exprimieren, die erkennen lassen, dass sie erst nach Abschluss der embryonalen Entwicklung aus renalen Vorläuferzellen entstanden sind [57]. Bis zu einem gewissen Grad scheint die Kompensation eines akuten Podozytenverlustes somit möglich zu sein. Lasagni et al. 2015 demonstrierten, dass das Ausmaß der Regeneration von dem Grad der Aktivierung der Vorläuferzellen abhängig ist, und zeigten damit auch einen potentiellen Ansatzpunkt für zukünftige Therapieverfahren auf [57]. Zum jetzigen Zeitpunkt bleiben die beschriebenen Mechanismen allerdings ohne klinische Relevanz, da sie bisher nicht zu neuen Behandlungsmethoden von Podozytenverlust geführt haben. Dies mag sich in Zukunft ändern, bis dato stellt eine Podozytopenie jeglicher Genese allerdings weiterhin eine ernsthafte, potentiell irreversible Bedrohung für die Nierenfunktion dar [39, 58]. Im Vergleich zu anderen Epithelien, bei denen es kontinuierlich zu Zellerneuerung kommt, weisen Podozyten aufgrund des fehlenden Turnovers eine deutlich längere Lebensspanne auf. Diese stellt gleichzeitig einen langen Zeitraum dar, in dem zur Schädigung der Zellintegrität kommen kann [39]. Die spezielle Fähigkeit zur Aufrechterhaltung ihrer Homöostase und zur Abwehr von zellulärem Stress über Jahrzehnte ist somit eine Eigenschaft der Podozyten, die von übergeordneter Bedeutung für die Funktion glomerulären Filtrationsbarriere und die Gesundheit der Patienten ist.

1.2.4 Podozyten in Zellkultur

Für die Erforschung molekularer Mechanismen, Erkrankungen und Eigenschaften von Zellen und Gewebe spielt die Methode der Zellkultur eine wichtige Rolle. Der Goldstandard, die Untersuchung von Patienten, ist unter anderem aus ethischen Gründen meist nicht praktikabel, und auch adäquate Tiermodelle sind nicht immer verfügbar [59]. Die Tatsache, dass es sich bei Podozyten um spezialisierte, ausdifferenzierte Zellen handelt, die über keine nennenswerte Proliferationsfähigkeiten verfügen, führte dazu, dass mit Podozyten lange Zeit nur bedingt in Zellkultur gearbeitet werden konnte. Unter Standardbedingungen kultiviert kam es zur Entdifferenzierung der Zellen. Die charakteristischen Fußfortsätze bildeten sich zurück, die Zellen hatten ein pflastersteinartiges Aussehen, und es erfolgte ein Verlust des Podozyten-spezifischen Proteins Synaptopodin. Damit waren wichtige Merkmale ausdifferenzierter Podozyten verloren, und die Zellen eigneten sich nur begrenzt für *in vitro* Studien zu Podozyten [60]. Der Podozyten-Forschung fehlte somit weitestgehend eine wichtige Methodik.

Diese Problematik wurde durch Etablierung von immortalisierten Podozyten-Zelllinie gelöst, bei denen es unter bestimmten Kulturbedingungen eine Ausdifferenzierung der Zellen erfolgt. Die Zelllinie sind sowohl humanen als auch murinen Ursprungs, und wurden durch Einschleusung des proliferationsfördernden tsA58 Antigens immortalisiert [61]. Da tsA58 gleichzeitig eine Thermosensitivität aufweist, lässt sich die Proliferation der Zellen durch Änderungen der Temperatur steuern [61]; die Immortalisierung der Zellen ist auf eine Temperatur von 33°C beschränkt. Erhöht man die Temperatur auf 37°C, kommt es zur Inaktivierung des tsA58 Antigens, und damit zum Erliegen der Proliferation. Im Anschluss kommt es zur Ausdifferenzierung der Zellen, mitsamt Expression der Podozyten-spezifischen Proteine Nephrin, Podocin und Synaptopodin, sowie der Ausbildung von Fußfortsätzen [60]. Diese Merkmale sprechen für eine hohe Ähnlichkeit der kultivierten Zellen mit ausgewachsenen, differenzierten Podozyten, sodass sich durch die Etablierung dieser Zelllinie zahlreiche neue Möglichkeiten für die Erforschung von Podozyten ergaben, die wir auch für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit nutzten.

Trotzdem bleibt zu bedenken, dass sich mit Hilfe der Zellkultur die Lebensbedingungen von Podozyten *in vivo* nur bedingt abbilden lassen. Podozyten bilden in Glomeruli komplexe, dreidimensionale Zellverbände, in denen die Zellen miteinander die Schlitzmembranen formen. Dabei sind sie mit ihrem den Kapillaren anliegenden Zellpol den Einflüssen von Kapillardruck bzw. -fluss und Filtration ausgesetzt, wodurch erhebliche Scherkräfte (*Shear stress*) auf die Podozyten wirken [62]. Der Zellpol in Richtung Bowman'schen Kapselraum ist hingegen von Primärharn umgeben, und ist somit

Einflüssen aus den ableitenden Harnwegen ausgesetzt. In Zellkultur lassen sich diese Bedingungen mit Zellen, die zweidimensional ausplattiert werden und von Medium umgeben sind, nur unzureichend abbilden, sodass sich daraus gewonnene Erkenntnisse nicht 1:1 auf Podozyten *in vivo* übertragen lassen [63].

1.3 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

Wie oben bereits beschrieben besteht die Hauptaufgabe der Podozyten in der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere, die aufgrund ihrer Lokalisation und Funktion auch als Blut-Harn-Schranke bezeichnet wird. Es handelt sich hierbei um einen selektiv-permeablen Filter, dessen physiologische Aufgabe darin besteht, den Übertritt von großen Plasmaproteinen, wie z.B. Albumin, vom Blut in den täglich ein Volumen von etwa 180l umfassenden Primärharn zu beschränken. Dabei ist die Barriere physiologischerweise nur für Proteine mit einer Größe kleiner der Albumins und für Wasser und Elektrolyte durchlässig [5, 64].

Die Filtrationsbarriere besteht aus 3 Komponenten, deren Zusammenspiel für die Integrität und damit für die physiologische Funktion verantwortlich ist (Abbildung 4):

das fenestrierte Endothel der Kapillaren,
die glomeruläre Basalmembran,
und die Schlitzmembran [19].

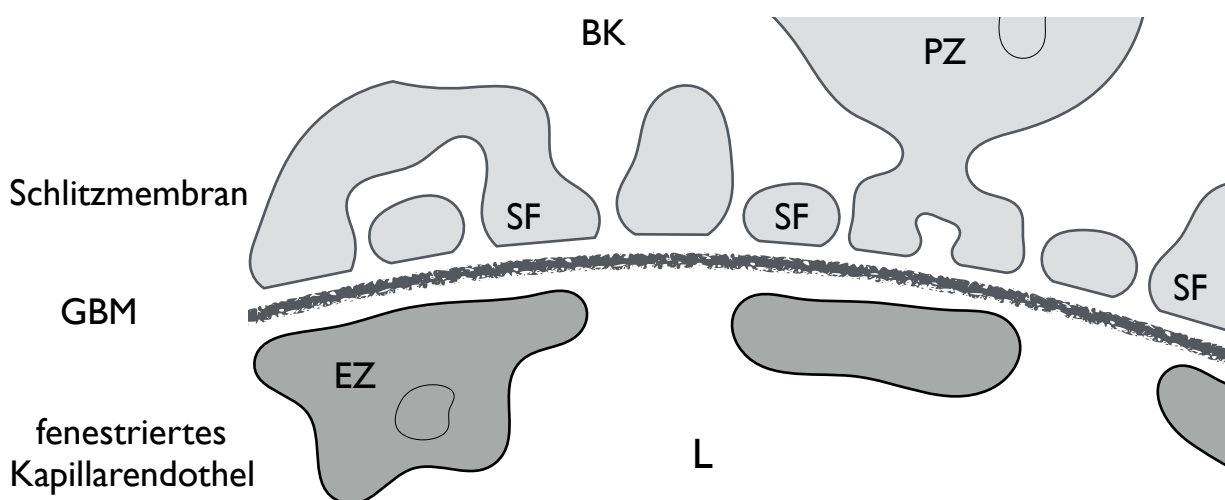


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere. BK: Bowman'scher Kapselraum. EZ: Endothelzellkörper. GBM: glomeruläre Basalmembran. L: Lumen einer glomerulären Kapillare. PZ: Podozytenzellkörper. SF: Sekundärfortsätze der Podozyten.

1.3.1 Das fenestrierte Endothel

Bei dem Endothel der glomerulären Kapillaren handelt es sich um spezialisiertes Endothel, das Lücken, bzw. Fenster, mit einem Durchmesser von ca. 60nm aufweist, die etwa 20-50% der Fläche der Gefäßwand ausmachen [65]. Dadurch stellt es das wahrscheinlich wasserdurchlässigste Endothel aller Säugetiere dar, das gleichzeitig aber eine hochselektiven Filtrationsbarriere für Makromoleküle ist [66].

Auf der entgegengesetzten Seite, in Richtung Harnpol, liegt den Endothelzellen die glomeruläre Basalmembran an, gefolgt von dem viszeralen Blatt der Bowman'schen Kapsel, das von Podozyten gebildet wird, die zwischen ihren Fußfortsätzen die Schlitzmembran formen. Die Zellen des Endothels tragen auch einen Teil zu der EZM der glomerulären Basalmembran bei [18], wobei der größere Anteil von den Podozyten produziert wird.

1.3.2 Die glomeruläre Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran (GBM) stellt nach dem fenestrierten Endothel der Kapillaren die zweite Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere dar, die der Primärharn auf dem Weg zum Bowman'schen Kapselraum überwinden muss [47]. Es handelt sich hierbei um eine blattartige Struktur die zwischen dem Gefäßendothel der Kapillarschlingen und den Podozyten liegt. Während der Schlitzmembran meist der größte funktionelle Anteil an der Proteinundurchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere zugeschrieben wird, konnte inzwischen gezeigt werden, dass Mutationen von GBM-spezifischen Molekülen ebenfalls zur insuffizienten Filtration mit Proteinurie führen kann [67]. Die Relevanz einer intakten GBM im Bezug auf eine intakte Filtrationsbarriere darf daher nicht unterschätzt werden und wird von manchen Autoren sogar als mindestens gleichwertig, wenn nicht sogar wichtiger, als die Schlitzmembran angesehen [68].

Im Gegensatz zu der Basalmembran anderer Epithelien, die ca. 40-80 nm Dicke messen, ist die Basalmembran der glomerulären Kapillaren mit 240-370 nm Dicke deutlich ausgeprägter [18]. Die Extrazellulärmatrix, aus der die GBM besteht, wird von den Endothelzellen und den Podozyten gebildet, wobei die Podozyten den maßgeblichen Anteil an der Synthese haben [24, 69]. Die Hauptbestandteile sind Typ IV Kollagen, Laminin, das Heparansulfat-Proteoglykan Agrin und Nidogene [69], wobei die Struktur und Funktion der Membran wesentlich von den Bestandteilen Kollagen und Laminin abhängt [18]. Die GBM hat, wie alle anderen Basalmembranen auch, eine negative Ladung.

1.3.3 Die Schlitzmembran

Bei der Schlitzmembran handelt es sich um eine äußerst komplexe Schicht aus extrazellulären Domänen verschiedener Transmembranproteine der Fußfortsätze. Die einzelnen Moleküle weisen zahlreiche Verbindungen untereinander auf und bilden so ein dichtes, heterogenes Netzwerk [70]. Aufgrund der Komplexität des Aufbaus ist die genaue Funktion der einzelnen Bestandteile noch nicht abschließend verstanden, sodass die Schlitzmembran ein wichtiger Bestandteil der aktuellen Forschung bleibt [71]. Die Poren, die zwischen den einzelnen Molekülen der intakten Membran bestehen bleiben, sind kleiner als das Protein Albumin [70]. Dadurch ist die Schlitzmembran wesentlich für die Protein-Undurchlässigkeit der GFB verantwortlich, was auch der Grund dafür ist, bei relevante Mengen an Protein im Ultrafiltrat von einer Funktionsstörung der Schlitzmembran ausgehen zu müssen [72].

Wie von Chugh et al. 2003 [71] zusammengefasst, sind die wichtigsten und am besten erforschten Bestandteile der Schlitzmembran Nephrin, Podocin, FAT1, CD2AP, Nephrin und P-Cadherin. Kommt es zu Podozytenverlust und damit zur Ablösung von Fußfortsätzen von der GBM, ist die Schlitzmembran davon direkt betroffen; ihre strukturelle und funktionelle Integrität wird zerstört, und die Funktion der GFB wird beeinträchtigt [47].

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass die Podozyten einen entscheidenden Teil zur Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere beitragen. Dies rechtfertigt den Aufwand, der betrieben wird, um die Biologie von Podozyten genauer zu erforschen, sowie die klinischen Bemühungen, den Verlust von Podozyten vorzubeugen.

Um zu verstehen, wie Podozyten die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere über Jahrzehnte gewährleisten, bedarf es der Untersuchung des Regelkreises zwischen dem Zellzyklusregulator p53 und dessen Haupt-Negativregulator MDM2.

1.4 Der Zellzyklus-Regulator p53

1.4.1 Das Molekül p53

Das Molekül p53 wurde 1979 entdeckt und 10 Jahre später erstmals als Tumorsuppressor charakterisiert [73-76]. Es ist für die Regulation der für Apoptose, Zellzyklusunterbrechung und DNA-Reparatur relevanten Gene maßgeblich verantwortlich, und wird daher auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [77-79]. Wenn man das Überleben von Zellen und die damit verbundenen Mechanismen erforschen möchte, führt an p53 kein Weg vorbei. Die über 25.000 Artikel, bei denen „p53“ im Titel erwähnt wird und die in dem Zeitraum der letzten drei Jahrzehnte publiziert wurden, unterstreichen die Relevanz und das hohe wissenschaftliche Interesse an dem Protein, das außerdem 1993 als „Molekül des Jahres“ ausgezeichnet wurde [80]. p53 besteht aus 393 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 54kDa [73, 80]. Es ist nach der Bande auf Höhe 53kDa schwerer Proteine benannt, die es bei einer Gelelektrophorese bildet. Das Gen *TP53* auf dem kurzen Arm vom Chromosom 17 (17.p13.1) kodiert für p53 [81]. p53 wird ubiquitär exprimiert und ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, wo es über die strukturelle Integrität der DNA wacht. Die p53-Spiegel sind physiologischerweise in Zellen niedrig, da p53 von seinem Hauptnegativregulator MDM2, der in dem zugehörigen Abschnitt detailliert besprochen wird, kontinuierlich dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Dieser Vorgang geht mit einer Halbwertszeit von etwa 20 Minuten einher [82]. Gleichzeitig induziert p53 die Bildung von MDM2, sodass zwischen p53 und MDM2 ein direkter Regelkreis besteht [83].

1.4.2 Wirkung von p53

p53 und dessen nachgeschalteter Signalweg vermindert die Folgen verschiedenster onkologischer Einflüsse auf Zellen, und stellt so den wichtigsten Tumorsuppressor des Organismus dar [84]. Nach traditioneller Ansicht erfolgt die Aktivierung von p53-vermittelten Prozessen über Stabilisierung des Moleküls, woraufhin eine Hemmung bzw. eine Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene erfolgt [85, 86]. Ob die daraus resultierenden Einflüsse auf die Zelle lediglich zu Zellzyklus-Unterbrechung, oder aber zu Apoptose führen, hängt von der Höhe der p53-Spiegel in der Zelle ab; vereinfacht lässt sich sagen, dass niedrige Spiegel, wie sie bei leichten Schädigungen der Zellen auftreten, eine Unterbrechung des Zellzyklus in der G1/S- und G2-Phase induzieren, sodass es zur Reparatur der Schäden kommen kann, während schwerwiegende, irreparable Beschädigungen der Zelle bzw. der DNA eine ausgeprägte Erhöhung der p53-Spiegel auslösen, dessen Folge Zelltod durch Apoptose ist [87-89].

Die Stabilisierung von p53 erfolgt durch posttranslationale Modifikation des Proteins, vor allem durch Phosphorylierung des N-terminalen Endes durch verschiedene Kinasen [90]. Die Kinasen werden dabei als Reaktion auf eine potentielle Zell- bzw. DNA-Schädigung aktiv. Diese kann z.B. durch ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika, oxidativen Stress oder fehlerhafte DNA-Replikation bei bevorstehender Zellteilung auftreten [91]. Die Phosphorylierung führt dazu, dass p53 nicht mehr durch MDM2 ubiquitiniert werden kann, und daher der proteasomale Abbau ausbleibt. Die p53-Spiegel steigen.

Die Antirepression beendet die direkte Unterdrückung von p53 durch MDM2. Dies erfolgt durch Acetylierung von p53, wodurch die p53-MDM2 Interaktion verhindert wird [92]. p53 ist nun frei, und kann sich mit seiner DNA-Bindungsdomäne sequenzspezifisch an die DNA anlagern [93], und seine Aktivität als Transkriptionsfaktor an p53-abhängigen Gene entfalten. Unter anderem bindet es dabei auch an zwei Abschnitte des MDM2-Gens [94, 95], wodurch wiederum die Transkription dessen gefördert wird, was zum Schluss des p53-MDM2-Regelkreises führt. Das C-terminale Ende von p53 stellt neben der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne eine weitere Region dar, mit der das Molekül an DNA binden kann, wobei diese Bindung nicht sequenz-, sondern strukturspezifisch erfolgt. Diese Bindung findet sich auch in nicht stimulierten Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass diese strukturspezifische Bindung die schnelle sequenzspezifische Bindung im Falle einer Schädigung der Zelle ermöglicht [96] und gleichzeitig an der Aktivierung des p21-Promotors beteiligt ist, der ebenfalls die Expression zellzyklus-regulierender Gene steuert [97]. p53 hat also sowohl in stimulierten als auch in geringerem Umfang in nicht stimulierten Zellen Einfluss auf die Genexpression.

Als Folge von Mutationen kann die Aktivität von p53 vermindert oder eingestellt sein, sodass die Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation nicht mehr gewährleistet ist, und Tumorentstehung gehäuft auftritt [98]. Deletionen oder Mutationen des TP53 Gens finden sich dabei in etwa 50% aller Tumore des Menschen, wobei der für die DNA-Bindungsdomäne des Moleküls kodierende Genabschnitt den Ort für die meisten krebsassoziierten Mutationen darstellt [99, 100]. Dabei gibt es Malignome, bei denen ein Großteil der Tumore eine p53-Mutation aufweisen (seröse Ovarialkarzinome: >90%), während andere Tumorarten kaum von p53-Mutationen betroffen sind (Schilddrüsenmalignome: <10%) [101]. Der Tumorsuppressor p53 ist somit ein wichtiges Schlüsselmolekül für die Entstehung verschiedenster Krebsarten. Auch experimentell lässt sich die Relevanz von p53 bei der Unterdrückung von Krebs deutlich demonstrieren: p53-Knockout Mäuse entwickeln sich zwar normal, spontane Tumorgenese tritt aber überdurchschnittlich häufig und in jüngerem Lebensalter auf [102]. Selbst wenn nur eine

Kopie des p53-Gens inaktiviert wird, zeigt sich ein ähnliches Bild mit erhöhtem Hang zu Tumorentwicklung im frühen Lebensalter [103, 104]. Im Umkehrschluss zeigt sich allerdings auch, dass bei erfolgreicher Wiederherstellung der p53-Aktivität eine Tumorregression erreicht werden kann [105, 106]. Der Erfolg dieser Strategie konnte bisher unter anderem für die Behandlung von Lymphomen und Sarkomen, sowie Leberzellkarzinomen in Mäusen, demonstriert werden [107, 108].

Diese Eigenschaft macht es zu einem potentiellen Ansatzpunkt für Krebstherapeutika, und lässt so das Molekül MDM2, welches den Hauptnegativregulator von P53 darstellt, ebenfalls in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses rücken [109].

1.5 Der p53-Inhibitor MDM2

1.5.1 Das Molekül MDM2

Murine Double Minute 2 (MDM2), beim Menschen auch als Human Double Minute 2 (HDM2) bezeichnet, ist ein 489 Aminosäuren großes, intrazelluläres Protein, welches von dem *MDM2-Gen* kodiert wird [110]. Seine wichtigste Funktion ist die Regulation der Stabilität und der Aktivität des Apoptose-vermittelnden Tumorsuppressors p53 [111-113]. Da die MDM2-Expression wiederum durch p53 induziert wird, entsteht zwischen den beiden Molekülen ein Regelkreis [83], durch den in Homöostase ein Gleichgewicht zwischen proliferativen und apoptotischen Stimuli auf die Zelle aufrechterhalten wird. Ein Beleg für die hohe Relevanz dieses auf direkter Interaktion von MDM2 und p53 auf molekularer Ebene basierenden Regelkreises [83] zeigt sich darin, dass ein generalisierter MDM2-Knockout zu einem bereits in der Embryonalphase letalen Phänotyp führt. Die Ursache für die Letalität liegt in der durch den Knockout bedingten fehlenden Negativregulation von p53, wie sich durch einen den Phänotyp rettenden gleichzeitigen Knockout des p53-Gens zeigen lässt [114, 115].

1.5.2 Interaktion zwischen MDM2 und p53

MDM2 erfüllt seine Funktion als wichtigster Regulator der Stabilität und Aktivität von p53 auf verschiedene Art und Weise (Abbildung 5).

Da MDM2 eine E3-Ubiquitin-Ligase ist, besteht der Hauptmechanismus der p53-Negativregulierung naturgemäß in der Ubiquitinierung des Moleküls [113, 116]. Dafür konjugiert MDM2 Ubiquitin-Moleküle direkt an das C-terminalen Ende von p53. Dabei wird unterschieden, ob es sich um eine Mono- oder um eine Poly-Ubiquitinierung handelt [117]. Liegt eine Poly-Ubiquitinierung vor, wird p53 von Proteasomen als Substrat erkannt und abgebaut [112, 118, 119]. Liegt eine Mono-Ubiquitinierung vor, kommt es zur Förderung des nukleären Exports von p53 durch MDM2 [120, 121]. p53 wird aus dem Nucleus entfernt und damit räumlich von der DNA getrennt, sodass es seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht mehr wahrnehmen kann. Anders als früher angenommen ist dieser Schritt allerdings für den Abbau von p53 nicht essenziell. Es konnte gezeigt werden, dass Ubiquitinierung [122] und proteasomale Degradation [123] sowohl im Zytoplasma als auch im Nucleus stattfinden.

Ein weiterer Mechanismus der p53-Regulation durch MDM2 ist die direkte Hemmung der transkriptionalen Aktivität von p53. Dafür bindet MDM2 an eine hydrophobe Tasche der N-terminale Region von p53, welche für die Interaktion mit den p53-kontrollierten Promotoren verantwortlich ist [111, 124]. Durch die Bindung kommt es zu einer Konfigurationsänderung der Interaktionsstelle von p53 und DNA, und damit zur Hemmung dessen Anlagerung an die DNA. Die Folge ist eine verminderte oder aufgehobene Transkription p53-abhängiger Gene, was einen stimulierenden Einfluss auf die Zellproliferation nach sich zieht. Dieser Vorgang der Transkriptionshemmung wird auch als Repression bezeichnet [111, 125, 126].

1.5.3 MDM2: Klinische Relevanz

MDM2 ist durch seine Funktion als Regulator des Tumorsuppressors p53 an wichtigen Steuermechanismen von Zelltod und Zellproliferation direkt beteiligt, und hat somit wichtigen Einfluss auf das Überleben von Zellen und Geweben.

Dies zeigt sich beispielsweise anhand der embryonalen Letalität von MDM2-Knockout Tieren [114, 115]. Aufgrund des fehlenden MDM2-vermittelten Abbaus von p53 akkumuliert der Tumorsuppressor in den Zellen, was eine stark erhöhte p53-Aktivität nach sich zieht. Durch die so gesteigerten pro-apoptotischen Einflüsse kommt es zu unkontrolliertem Zelltod und Gewebeuntergang, der mit dem Überleben der Embryos nicht vereinbar ist. Der gleiche Effekt konnte auch für den zelltypspezifischen Knockout in murinen

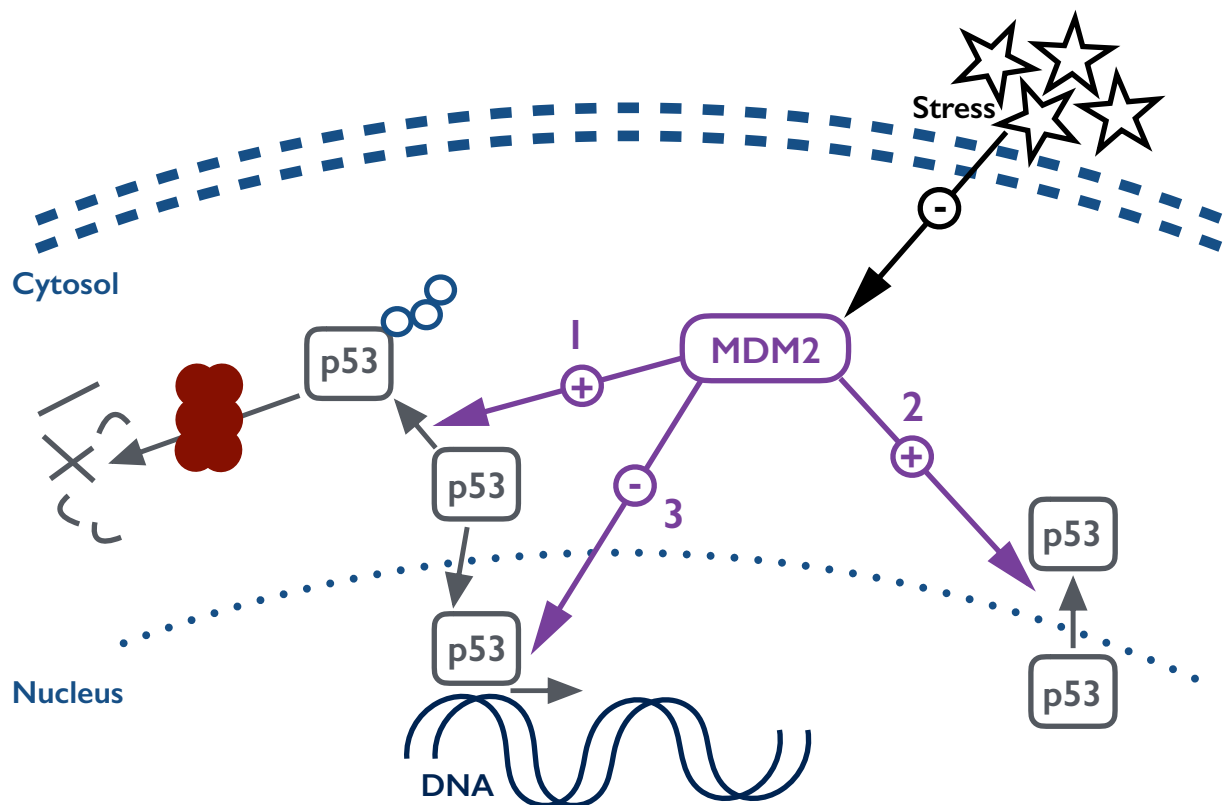


Abbildung 5: Regulation von p53 durch MDM2. MDM2 reguliert die Aktivität von p53 durch 3 verschiedenen Mechanismen: (1) MDM2 ubiquitiniert p53 und führt es so dem proteasomalen Abbau zu. (2) MDM2 fördert den nukleären Export von p53, sodass es nicht mehr als Transkriptionsfaktor fungieren kann. (3) MDM2 hemmt die transkriptionale Aktivität durch direkte Inhibition. Die Funktion von MDM2 selber wird durch verschiedenste Formen von Stress, die auf die Zelle wirken, unterdrückt (schwarzer Pfeil).

Kardiomyozyten gezeigt werden [127]. Durch den Verlust von Kardiomyozyten aufgrund p53-vermitteltem Zelluntergang kommt es zu Herzversagen und damit zum Tod in der Embryonalphase. Dass die beobachteten Effekte durch die fehlenden p53-Regulation durch MDM2 bedingt waren, wurde durch einen gleichzeitigen Knockout von p53 belegt: Die embryonale Letalität sowohl des generalisierten als auch des zelltypspezifischen Knockouts ließ sich auf diese Weise verhindern, da das Fehlen von p53 die Folgen des MDM2-Knockouts aufhob [114, 115, 127].

Aber nicht nur zu wenig, sondern auch das Vorkommen von zu viel MDM2 ist mit ernststen Konsequenzen für den Organismus verbunden. Der Grund für erhöhte MDM2-Spiegel kann in Amplifikationen des MDM2-Gens [128], in einer durch aktiviertes p53 erhöhten Expression [129], oder auch in Molekülveränderungen, die den proteasomalen Abbau verhindern [130], liegen. Durch das vermehrte Auftreten von MDM2 kommt es daraufhin zu verstärktem p53-Abbau und verminderter Aktivität des Tumorsuppressors [131, 132]. Fehlende Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation sind die Folge, Zellen können nun auch beispielsweise nach DNA-Schäden proliferieren. Als Folge dessen kommt es

Tabelle 1: MDM2-/p53-Mutationsraten (nach Wade et al. 2013)

Tumorart	MDM2-Mutationsrate	p53-Wildtyp	p53-Mutation	Quelle
Glioblastome	14 %	20 %	0 %	136
diff. Liposarkome	70 %	0 %	0 %	137
Melanome	37 %	46 %	0 %	138
Mamma-CA	31 %	80 %	14 %	139
Ösophagus-CA	18 %	21 %	14 %	141; 142
Osteosarkome	16 %	14 %	14 %	135
Kolorektale-CA	9 %	65 %	35 %	143

CA: Karzinom

bereits in frühem Lebensalter zu einer erhöhten Tumorzinzidenz, und beispielsweise zur Entstehung von Karzinomen, Lymphomen, oder Sarkomen [133-135].

Veränderungen des MDM2-Gens in Tumoren wurde im Rahmen einer Studie an insgesamt über 3500 Gewebeproben untersucht. Dabei wurden Mutationen in insgesamt 19 verschiedenen Tumorarten festgestellt [131], von denen Sarkome, Melanome und Mammakarzinome am häufigsten betroffen sind [101, 144]. Einen Überblick verschafft Tabelle 1. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von MDM2- und p53-Mutationen in Tumoren in der Regel negativ korreliert, sodass meist entweder eine p53- oder eine MDM2-Mutation vorliegt [131]. Die Ursache dafür liegt darin, dass eine MDM2-Amplifikation bzw. -mutation nur dann einen Wachstumsvorteil darstellt, wenn gleichzeitig Wildtyp p53 vorliegt, dessen Aktivität durch die mutationsbedingten erhöhten MDM2-Spiegel effektiv gehemmt werden kann [145].

Die zentrale Bedeutung der regulatorischen Funktion von MDM2 zeigt sich also auf verschiedenste Weise, von embryonaler Letalität aufgrund exzessiven Gewebeeruntergangs, bis hin zur Tumorentstehung aufgrund des aus dem Gleichgewicht geratenen MDM2-p53-Regelkreises. Da für Podozyten gezeigt werden konnte, dass in ihnen eine im Vergleich zu anderen Geweben starke MDM2-Expression vorliegt [146], sind wir davon ausgegangen, dass MDM2 gerade in diesen Zellen eine wichtige Funktion wahrnimmt. In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, welchen Folgen niedrige MDM2-Spiegel beziehungsweise Störungen des MDM2-p53 Regelkreises in Podozyten nach sich ziehen können.

1.5.4 MDM2 und Tumorthherapie

MDM2 stellt einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Tumorthapien dar [147]. Durch Hemmung der Negativregulation von p53 durch MDM2 sollen die p53-Spiegel in Tumoren erhöht werden, und somit eine Tumorregression eingeleitet werden [148]. Der Erfolg dieser Methode wurde dabei schon in verschiedenen Studien demonstriert [107, 108, 149]. Für die Hemmung der Negativregulation von p53 durch MDM2 gibt es dabei verschiedene Ansatzpunkte, deren gemeinsames Ziel die Aktivierung bzw. Erhöhung des Spiegel von p53 ist: Erstens, eine Senkung der MDM2-Expression [150], zweitens, eine Hemmung der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität [151, 152] und drittens, eine Störung der MDM2-p53 Interaktion [153]. Da die molekulare Struktur der MDM2-p53-Bindungsstelle gut erforscht ist [154, 155], wurde in den letzten Jahren der Schwerpunkt auf die Störung der MDM2-p53 Interaktion gelegt, sodass hierfür inzwischen verschiedene Substanzen zur Verfügung stehen [156-160]. Die zu der Gruppe der cis-Imidazoline gehörende Nutline Nutlin-1, Nutlin-2 und Nutlin-3 gehören zu dieser Art Moleküle, die von Vassilev et al. 2004 entdeckt wurden [159], und die seitdem in verschiedenen Studien untersucht wurden. Meist kam dabei Nutlin-3 zum Einsatz, da es die höchste Affinität zu MDM2 aufweist [161]. Unter anderem konnte damit das Tumorwachstum in Mäusen mit Xenotransplantaten einer humanen Osteosarkom-Zelllinie, sowie zwei humanen Prostatakarzinom-Zelllinien gehemmt, und die Tumorzellen zur Apoptose gezwungen werden [162]. Aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit und hohen Toxizität von Nutlinen konnten diese Substanzen allerdings nicht erfolgreich in der Klinik eingesetzt werden [163], sodass neue, Nutlin-ähnlichen Substanzen mit besserer Bioverfügbarkeit und Verträglichkeit entwickelt wurden, die aktuell in klinischen Studien weiter untersucht werden (Tabelle 2, Stand Dezember 2015). Zur Steigerung der Wirksamkeit erfolgt dabei sowohl eine Kombination mit Zytostatika als auch mit monoklonalen Antikörpern [163]. Bei der systemischen Gabe von MDM2-Inhibitoren gilt es allerdings zu beachten, dass nicht nur Tumorzellen der Substanz ausgesetzt sind, sondern auch alle anderen Gewebe des behandelten Organismus. Die Wirkungen auf die übrigen Zellen und Zellverbände sind wichtige und letztendlich potentiell limitierenden Faktoren bei dem Einsatz der MDM2-Inhibitoren als Krebstherapeutika.

Tabelle 2: MDM2 Inhibitoren in klinischen Studien (nach Burgess et al. 2016)

Substanzklasse	Substanz	Status	NCT-Kennung
Cis-Imidazoline	RG7112	Phase 1 bei fortgeschrittenen soliden und hämatologischen Malignomen sowie Liposarkomen (abgeschlossen)	NCT00559533
	RG7112	Phase 1 bei akuter myeloischer Leukämie (abgeschlossen)	NCT01635296
	RG7112	Phase 1 bei Weichteilsarkomen (abgeschlossen)	NCT01605526
	RO5503781	Phase 1 bei soliden Malignomen (abgeschlossen)	NCT01462175
	RO5503781	Phase 1 bei akuter myeloischer Leukämie (aktiv)	NCT01773408
	RO5503781	Phase 1/2 bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom (rekrutierend)	CRUKE/12/032
Spiro-Oxindole	SAR405838	Phase 1 bei fortgeschrittenen soliden Malignomen (aktiv)	NCT01636479
	SAR405838	Phase 1 bei fortgeschrittenen soliden Malignomen (rekrutierend)	NCT01985191
Imidazothiazole	DS-3032b	Phase 1 bei fortgeschrittenen soliden Malignomen (rekrutierend)	NCT01877382
Dihydroisoquinolinone	CGM-097	Phase 1 bei fortgeschrittenen soliden Malignomen (rekrutierend)	NCT01760525
unbekannt	HDM201	Phase 1 bei fortgeschrittenen soliden und hämatologischen Malignomen (rekrutierend)	NCT02143635
	HDM201	Phase 1b/2 bei Liposarkomen (rekrutierend)	NCT02343172
Piperidine	MK4828	Phase 1 bei akuter myeloischer Leukämie (abgebrochen)	NCT01451437
Piperidinone	AMG232	Phase 1 bei soliden Malignomen und Multiplem Myelom (rekrutierend)	NCT01723020
	AMG232	Phase 1b/2a bei metastasierendem Melanom (rekrutierend)	NCT02110355
Pyrrolidine	RG7388	Phase 1 bei Polycythaemia vera und essentieller Thrombozythämie (rekrutierend)	NCT02407080

1.5.5 MDM2 in der Niere

Im Gegensatz zu dem Gebiet der Onkologie ist die Funktion von MDM2 für die Homöostase der Niere und im Rahmen von nicht-neoplastischen Erkrankungen oder Entzündungen der Niere vergleichsweise wenig untersucht. Dabei wird MDM2 in renalen Epithelzellen, und damit auch in Podozyten, im Vergleich zu anderen Geweben verstärkt exprimiert [164]. Bekannt ist, dass MDM2 auch in der Niere wichtige regulatorische Funktionen, und zwar, wie in anderen Geweben auch, hauptsächlich in Zusammenspiel mit dem Tumorsuppressor p53, erfüllt. Dabei können Fehlregulationen dieses Zusammenspiels auch in Nierenzellen die aus der Onkologie bekannten Folgen haben: eine verstärkte MDM2-bedingte Hemmung von p53 kann beispielsweise zur Entstehung von Nierenzellkarzinomen führen [165]. Aber auch unabhängig von Tumorentstehung und -progression hat MDM2 eine hohe Relevanz für die Niere. Schon während der Organogenese ist MDM2 für die physiologische Entwicklung der Nieren mitverantwortlich. Eine selektiven MDM2-Deletion aus dem Epithel der Ureterknospe hat beispielsweise eine Hypodysplasie der Nieren und den postnatalen Tod der Versuchstiere zur Folge [166]. Und auch eine Deletion von MDM2 in den Vorläuferzellen der Nephrone führt zu fehlerhafter Entwicklung der selbigen, und den damit verbundenen Einschränkungen der Nierenfunktion [167]. Neben der renalen Entwicklung fördert MDM2 auch Entzündungsprozesse des Nierenparenchyms. In einem renalen Ischämie-Reperusions-Modell konnte durch MDM2-Suppression dadurch ein verringertes Ausmaß der postischämischen Entzündungsprozesse demonstriert werden [164]. Ein ähnlicher Effekt konnte für das Krankheitsbild der rasch progressiven Glomerulonephritis beschrieben werden, dessen Verlauf sich durch MDM2-Suppression abmildern lässt [168]. Und auch Nephritiden im Rahmen eines Modells des systemischen *Lupus erythematoses* zeigen unter MDM2-Suppression einen abgeschwächten Verlauf, und die Versuchstiere weisen ein im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängertes Überleben auf [169]. MDM2 hat somit eine pro-inflammatorische Wirkung im Rahmen von Erkrankungsprozessen der Niere. Neben dieser pro-inflammatorischen Wirkung konnte in der Niere aber auch eine pro-regenerative Wirkung von MDM2 nachgewiesen werden. Wenn MDM2 im Anschluss an eine ischämische Schädigung der Niere supprimiert wird, kommt es zu einer deutlich reduzierten Regeneration des Tubulusepithels [164]. Dieser *in-vivo* beobachtete pro-regenerative Effekt von MDM2 auf Tubuluszellen konnte auch in einem *in-vitro* Modell zum akuten Nierenversagen bestätigt werden [170]. Eine weitere in der Niere relevante Eigenschaft von MDM2, die zunächst scheinbar im Gegensatz zu den beschriebenen zu stehen scheint, ist eine verstärkende Wirkung auf Podozytenverlust nach Podozyten-

schädigung, was den Progress einer beginnenden Glomerulosklerose fördert. Dieser Effekt wird, wie oben bereits beschrieben, auf die fehlende Fähigkeit der Podozyten zur Zytokinese im Rahmen der Mitose zurückgeführt. Die MDM2-bedingte Suppression des Zellzyklus-Regulators p53 führt dabei zu einer Induktion der Mitose bei Podozyten, die in einer Ablösung und damit Verlust dieser resultiert. MDM2 hat damit einen negativen Einfluss auf das Überleben von Podozyten der nach Podozytenschädigung bestehenden Restpopulation. Mulay et al. demonstrierten, dass MDM2-Suppression in dem Modell einer Adriamycin-induzierten Nephropathie einem positiven Effekt auf das Überleben dieser Podozyten haben kann [146]. MDM2-Suppression verhindert somit weiteren Podozytenverlust. Ob sich ein vergleichbarer, protektiver Effekt von MDM2-Suppression auch in nicht stimulierten Podozyten nachweisen lässt, war bisher unbekannt, und stellte somit die Motivation für diese Arbeit dar.

1.6 Hypothese

Chronische Nierenerkrankungen haben eine weltweit steigende Prävalenz [5], und belasten durch ihre im fortgeschrittenen Stadium teure und komplexe Behandlung die Ressourcen aller Gesundheitssysteme [11]. Das bei CKD deutlich erhöhte Risiko für Folgeerkrankungen, die erhöhte Mortalität, sowie der vor allem in Entwicklungs- und Schwellenländern fehlende Zugang zu adäquater Versorgung, führt seit Jahren zu einem Anstieg der durch CKD bedingten Todesfälle [9, 10, 13].

Fast 90% aller chronischen Nierenerkrankungen werden durch Glomerulosklerose verursacht, deren Entstehung in einem Großteil der Fälle auf Erkrankungen bzw. Verlust von Podozyten zurückzuführen ist [21, 22, 39]. Der Podozyt stellt damit ein zentrales Element bei der Entstehung von CKD, und damit für die Krankengeschichte von Millionen von Patienten, dar [39, 40]. Der wesentliche Unterschied zwischen Podozyten und anderen Epithelien liegt in der fehlenden adäquaten Proliferations- bzw. Regenerationsfähigkeit nach Podozytenverlust [58]. Podozyten haben daher Mechanismen, die zu einer hohen Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenster Noxen führt, und es den Zellen erlaubt, jahrzehntelang zu überleben und ihre Funktion zu erfüllen [39]. Mulay et al. 2013 [146] konnten zeigen, dass in Podozyten hohe Spiegel des Moleküls MDM2 exprimiert werden, welches der Hauptnegativregulator der Funktion und Expression des proapoptotischen und Zellzyklus unterbrechenden Tumorsuppressors p53 ist. Wir vermuteten daher, dass es für Podozyten wichtig ist, ihre p53-Spiegel in engen Grenzen zu halten, um Zelluntergang zu vermeiden. Mulay et al. 2013 zeigten aber auch, dass die Blockade von MDM2 einen positiven Einfluss auf die Regeneration von stimulierten Podozytenpopulationen haben kann [146]. Bis dato lagen allerdings keine Studien vor, die diesen bisher unbekannten Effekt von MDM2 in nicht stimulierten Podozyten zu verifizierten. Auch mit Hinblick auf den systemischen Einsatz von MDM2-Inhibitoren als neuartige Krebstherapeutika, welche auch zu einer Senkung von MDM2-Spiegeln in den Podozyten führen, wurden in dieser Arbeit daher die Effekte von niedrigen MDM2-Spiegeln speziell in Podozyten, und damit folgende Hypothese, untersucht:

Hypothese:

MDM2 und die damit verbundene Negativregulation der p53-Spiegel ist für das Überleben von Podozyten und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Stress essenziell. Ohne MDM2 kommt es zum frühzeitigen Verlust von Podozyten. Damit befähigt MDM2 Podozyten, die glomeruläre Filtrationsbarriere über Jahrzehnte aufrecht zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Elektronenmikroskop 1200EX	JEOL, Tokyo, JPN
Elektrophorese-Gel-Kammer MiniVE	Amersham, Glattbrugg, CH
Elektrophorese-Spannungsquelle Power PAC 3000	BioRad, München, DE
ELISA-Reader GENios Plus	Tecan, Crailsheim, DE
ELISA-Washer ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall, DE
Entwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Köln, DE
Eppendorf-/Falcon-Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml, 15ml, 50ml)	TPP, Trasadingen, CH
Inkubator Heracell 150	Heraeus Sepatech, Osterode, DE
Inkubator Typ B5060	Heraeus Sepatech, Osterode, DE
Kamera Canon S95	Canon, Tokio, JP
Konfokalmikroskop LSM 510	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
Homogenisator Ultra Turrax T25	IKA-Werke, Staufen, DE
Lichtmikroskop Leica DMRBE	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Lichtmikroskop Leica Wild M10	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
LightCycler 480	Roche Life Science, Basel, CH
Magnetrührer IKAMAG REO	IKA-Werke, Staufen, DE
Mikrotom HM 340E	Microm, Heidelberg, DE
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, DE
Pipette Easypet	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Pipetman (2, 10, 20, 100, 200, 1000µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipette Pipetus	Hirschmann Lgeräte, Eberstadt, DE
Pipette Research Plus (30-300µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipette Research Pro (5-100µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen Sapphire (10µl, 200µl, 1000µl)	Grainer Bio-One, Frickenhausen, DE
Photometer DU 530	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München, DE
Software LSM	Carl Zeiss, Oberkochen, DE

Sicherheitswerkbank SterilGard Class II, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, USA
Sicherheitswerkbank Microflow Class II	Nunc, Wiesbaden, DE
Thermocycler UNO-II	Biometra, Göttingen, DE
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DE
UV-Licht	Bachofer LG, Reutlingen, DE
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen, DE
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, DE
Waage Mettler P1200N	Mettler Toledo, Gießen, DE
Zählkammer Neubauer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode, DE
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, DE

2.1.2 Materialien für Tierexperimente

DNA-Isolation

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Proteinase K	Merck, Darmstadt, DE
PBND Puffer	2,5ml 2M KCl, 1ml 1M Tris-HCl, 0,25ml 1M MgCl ₂ , 10ml 0,1 % Gelatine, 0,45ml 100 % NP40, 0,45ml 100 % Tween-20; mit H ₂ O auf 100ml auffüllen

Polymerase-Kettenreaktion

Master-Mix:	
10 x PE-Puffer	ThermoFisher, Waltham, USA
1,25mM dNTPs	Metabion GmbH, Planegg, DE
Taq-DNA-Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
PCR-Optimizer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Primer	Metabion GmbH, Planegg, DE
MDM2 FLOX Forward	5'-TGTGGAGAAACAGTTACTTC-3'
MDM2 FLOX Reverse	5'-CTGTGCTCCTTCACAGAG-3'
Cre Forward	5'-AGGTTTCGTTCACTCATGGA-3'
Cre Reverse	5'-TCGACCAGTTTAGTTACCC-3'

Gelelektrophorese

Agarosepulver	ThermoFisher, Waltham, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ladepuffer 6x	ThermoFisher, Waltham, USA
FastRuler Low Range DNA Ladder	ThermoFisher, Waltham, USA
1 x TBE-Puffer	108g Tris, 55g Borsäure, 5,84g EDTA, auf 10l H ₂ O auffüllen

Blutentnahme

EDTA	Biochrom, Berlin, DE
Isofluran Forene	Abbott, Chicago, USA
Blaubrand Mikropipetten 20µl	Blau, Wertheim, DE

Organentnahme

Formaldehyd	ThermoFisher, Waltham, USA
RNA-later	Qiagen GmbH, Hilden, DE
Einbettkassetten	Simport, St.-M.-de-Beloeil, CA

Isolation der Glomeruli

Dynabeads® M-450 tosylactivated	ThermoFisher, Waltham, USA
1ml Spritze Omnifix®	B. Braun, Melsungen, DE
G20 Kanüle Sterican®	B. Braun, Melsungen, DE
Zellsieb 100µm	ThermoFisher, Waltham, USA
Magnet DynaMag®-Spin	Life Technologies, Carlsbad, DE
Kollagenase 1A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	10x HBSS 1: 4g KCl, 0,9g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O, 0,6g KH ₂ PO ₄ , 3,5g NaHCO ₃ , 80g NaCl, 10g D-Glucose, mit H ₂ O auf 1l auffüllen, pH 7,4. 10x HBSS 2: 1,91g CaCl ₂ x 2 H ₂ O, 1g MgCl ₂ x 6 H ₂ O, 1g MgSO ₄ x 7 H ₂ O. 1x HBSS: 100ml HBSS 1 + 900ml H ₂ O + 100ml HBSS 2.

2.1.3 Materialien für molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

PureLink® RNA Mini Kit	ThermoFisher, Waltham, USA
RNase-Free® DNase Set	Qiagen, Hilden, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
100 % Ethanol	Merck, Darmstadt, DE

cDNA-Synthese

5 x First strand Buffer	ThermoFisher, Waltham, USA
25mM dNTPS	GE Healthcare, Chalfont-Giles, GBR
0,1M DTT	ThermoFisher, Waltham, USA
linear-Acrylamid	ThermoFisher, Waltham, USA
Hexanucleotide-Mix	Roche Life Science, Basel, CH
Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAasin®	Promega, Fitchburg, USA
Superscript II (Reverse Transkriptase)	ThermoFisher, Waltham, USA

Realtime-Polymerase-Kettenreaktion

Master Mix	siehe oben
Primer	Metabion, Planegg, D
MDM2 Forward	5`-TGTGAAGGAGCACAGGAAA-3`
MDM2 Reverse	5`-TCCTTCAGATCACTCCCACC-3`
NPHS2 Forward	5`-TGACGTTCCCTTTTCCATC-3`
NPHS2 Reverse	5`-CAGGAAGCAGATGTCCCAGT-3`
SYNPO Forward	5`-AGGAGCCCAGGCCTTCTCT-3`
SYNPO Reverse	5`-GCCAGGGACCAGCCAGATA-3`

Kreatinin-Messung

Creatinine Kit	DiaSys, Holzheim, DE
----------------	----------------------

Protein-Isolation

RIPA-Buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatase-Inhibitor	10mM NaF, 10mM Na ₃ VO ₄
cOmplete™ Protease-Inhibitor	Roche Life Science, Basel, CH

Protein-Standart	BioRad, München, DE
Bradford-Reagenz	BioRad, München, DE
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, DE
SDS	BioRad, München, DE
β -Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
4x-Proben-Puffer	3,8ml H ₂ O, 1ml 0,5M Tris-HCl, 0,8ml Glycerol, 1,6ml 10% SDS, 0,4ml β -Mercaptoethanol, 0,4ml 1% Bromphenolblau

2.1.4 Materialien für immunologische Methoden

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Mouse Albumin ELISA Quantitation Set	Bethyl-Lab's, Montgomery, USA
Beschichtungs-Puffer	0,1M Natriumkarbonat: 7,13g NaHCO ₃ , 1,59g Na ₂ CO ₃ , mit H ₂ O auf 1l auffüllen, pH 9,5
PBS	80g NaCl, 11,6g Na ₂ HPO ₄ , 2,0g KH ₂ PO ₄ , 2,0 g KCl, mit H ₂ O auf 10l auffüllen, pH 7,0
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasch-Lösung	PBS, 0,05 % Tween-20
Blocking-Puffer	PBS, 2% BSA
TrisNaCl	6,06g Tris, 8,18g NaCl, mit H ₂ O auf 1l auffüllen, pH 8,0
Proben-Verdünner	TrisNaCl, 1 % BSA, pH 8,0
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA
ELISA Stop Lösung: 2N H ₂ SO ₄	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Western-Blot

Protein-Marker IV	PeqLab, Erlangen, DE
Immobilon®-PVDF Membran	Millipore, Schwalbach, DE
Filter Whitman Papers	Millipore, Schwalbach, DE
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

TAE	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agarose	MP Biomedicals, Eschwege, DE
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumperoxodisulfat	BioRad, München, DE
TEMED	BioRad, München, DE
Amersham ECL WB Detection Kit	GE Healthcare, Amersham, UK
10x Running-Buffer	30g Tris, 144g Glycin, 5g SDS, mit H ₂ O auf 1l auffüllen, pH 8,3.
1x Transfer-Buffer	1,5g Tris, 7,2g Glycin, mit H ₂ O auf 500ml auffüllen.
10x TBS	24,2g Tris, 80g NaCl, 17,5 ml HCL, mit H ₂ O auf 1l auffüllen, pH 7,6.
1x TBS-T	1l TBS, 1ml Tween 20
Stripping-Buffer Restore™	ThermoFisher, Waltham, USA

2.1.5 Materialien für histologische Methoden

PAS-Färbung

Periodic Acid-Schiff-Kit	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, DE

Silber-Färbung

Periodsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Thiosemicarbazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd	ThermoFisher, Waltham, USA
Hydrogennitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Silbernitrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methenamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
di-Natriumtetraborat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hematoxylin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eosin (1mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Gold-Chlorid-Lösung (200mg/dl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Stock-Methenamin-Lösung	500ml H ₂ O, 15g Methenamin
Stock-Silber-Lösung	50ml H ₂ O, 2,5g Silbernitrat

Stock-Natrium-Borat-Lösung

50ml H₂O, mind. 3g Natrium-Borat,
bis Lösung gesättigt ist

Hydrogennitrat-Formaldehyd-Lösung

10ml Hydrogennitrat, 5ml 37%
Formaldehyd, 485ml H₂O

Immunfluoreszenz/Immunhistochemie

Anti-mouse Nephrin (Meerschweinchen)

Acris Antikörper, Herford, DE

Anti-mouse WT1 (Kaninchen)

SantaCruz Biotech, Santa Cruz, USA

Anti-pig Alexa-488 (Ziege)

ThermoFisher, Waltham, USA

Anti-rabbit Cy3 (Ziege)

Jackson IR Labs, West Grove, USA

Anti-mouse MDM2 (Kaninchen)

Abcam, Cambridge, UK

Anti-mouse p53 (Kaninchen)

Vector Laboratories, Burlingame, CA

Anti-rabbit Biotin (Ziege)

Vector Laboratories, Burlingame, CA

Unmasking Solution

Vector Laboratories, Burlingame, CA

Avidin/Biotin Blocking Kit

Vector Laboratories, Burlingame, CA

DAPI

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Ziegen-Serum

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

TRIS-Hydrochlorid

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Avidin-Biotin Complex Reagenz

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

DAB

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Nickel(II)-Chlorid

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Wasserstoffperoxid

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

DAB-Färbelösung

200ml TRIS-HCl (37°C), 4ml DAB

1ml NiCl₂, 500µl 3% H₂O₂

Methylgrün

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

VectaMount Permanent Mounting Medium

Vector Laboratories, Burlingame, CA

Elektronenmikroskopie

Glutaraldehyd

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Paraformaldehyd

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kakodylsäure

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Propylenoxid

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Embed-812

EM Sciences, Hatfield, USA

Uranylacetat

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Bleicitrat

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.6 Materialien für *in vitro* Methoden

Zellkultur

Petrischalen/6-Loch-Platten

Medium RPMI1640

FBS

Penicillin/Streptomycin

Sodiumpyruvat

Sodiumbicarbonat

HEPES

Trypsin / EDTA

Kollagen IV

TPP ZKBedarf, Trasadingen, SUI

ThermoFisher, Waltham, USA

Biochrom KG, Berlin, DE

PAA Labs, Pasching, AUT

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

ThermoFisher, Waltham, USA

PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

LDH-Messung/Stimulation

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)

Pam3C

Nutlin-3

Triton-X-100™

Roche Life Science, Basel, CH

InvivoGen, San Diego, USA

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.2 Tierexperimente

2.2.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal 5 Tieren in mit Einstreu und Zellstoff versehenen Käfigen und einem 12-stündlichem hell-dunkel-Zyklus gehalten. Die Tiere hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Käfige, Einstreu, Zellstoff, Futter und Wasser wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

Umsetzen und Trennen der Jungtiere wurde stets in einer sterilen Umgebung durchgeführt. Die Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes sowie die Richtlinien der Europäischen Union wurden während der Versuche zu jedem Zeitpunkt eingehalten. Die Genehmigung der Regierung von Oberbayern wurde vor Versuchsbeginn eingeholt.

2.2.2 Studiendesign

Um festzustellen, welche Rolle MDM2 in Podozyten spielt, wie sich eine verminderte Expression auf die Funktion der Nieren auswirkt, und welche systemischen Auswirkungen auf den betroffenen Organismus sich dadurch feststellen lassen, stellten wir Mäuse mit einem Podozyten-spezifischem MDM2-Knockout her. Dadurch, dass MDM2 in allen übrigen Gewebe in einem normalen Maße exprimiert wurde, erlaubte dies die selektive Beobachtung der Funktion des Moleküls in Podozyten. Da die zu untersuchenden Mäuse nach erfolgreicher Kreuzung einen gemischten genetischen Hintergrund hatten, wurden als Kontrolle Wurfgeschwister der homozygoten Versuchstiere verwendet. Die Beobachtung und Charakterisierung des Phänotyps erfolgte über einen Zeitraum von maximal 56 Wochen.

2.2.3 Herstellung der MDM2^{ΔPodozyt} Mäuse

Zur Herstellung eines Podozyten-spezifischen MDM2-Knockouts wurde das Cre-/loxP-System verwendet. Mit dessen Hilfe lassen sich bestimmte Gene spezifisch in einzelnen Zellarten ausknocken. Dafür werden der Anfang und das Ende der zu entfernenden DNA-Abschnitts durch gentechnische Verfahren mit sogenannten loxP-Stellen markiert. Diese loxP-Stellen werden im nächsten Schritt von sogenannten Cre-Rekombinasen (cre: *causes recombination*) erkannt, die die DNA daraufhin an der entsprechenden Stelle auseinander „schneiden“ und so den markierten Genabschnitt entfernen (Abbildung 6). Die Spezifität für einzelne Zelltypen wird dadurch erreicht, dass die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Promotors exprimiert wird, der nur in den Zellen aktiv ist, in der

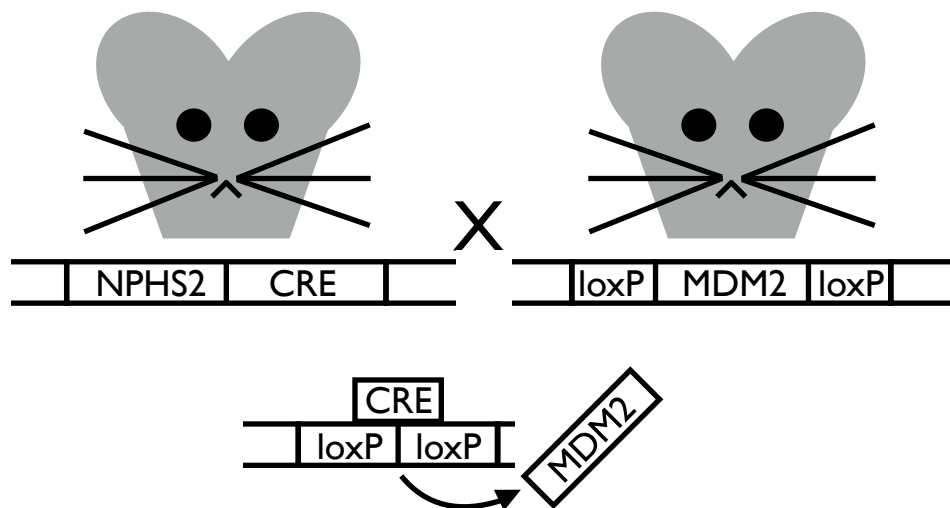


Abbildung 6: Herstellung der $MDM2^{\Delta Podozyt}$ -Mäuse. Die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Podocin-Promotors entfernt das gefloxt MDM2-Gen selektiv in Podozyten.

der Knockout erfolgen soll. Dadurch wird die Cre-Rekombinase in den übrigen Geweben des Organismus nicht exprimiert, sodass der mit loxP-Stellen markierten DNA-Abschnitte erhalten bleiben, und damit alle Gene exprimiert werden können.

Wir verwendeten Mäuse, deren Exon 4 und 5 des MDM2 Gens von LoxP-Stellen flankiert wurden. Diese $MDM2^{lox/lox}$ Mäuse, die einen gemischten BL/6 Hintergrund hatten, stammten aus dem Labor von Guillermina Lozano, PhD, University of Texas, USA. Wir kreuzten sie mit Mäusen, die eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des podozyten-spezifischen Promotors des Nphs2-Gen, welches für Podocin codiert, exprimierten. Diese $Nphs2\text{-cre}^+$ Mäuse, die einen C57BL/6 Hintergrund hatten, wurden freundlicherweise von Prof. Tobias Huber, Universität Freiburg, bereitgestellt.

2.2.4 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mit DNA, die aus einer Gewebeprobe der Schwanzspitze gewonnenen wurde. Die zu untersuchenden Genabschnitte wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt und anschließend durch Gelelektrophorese in entsprechende Banden aufgetrennt und ausgewertet.

DNA-Isolierung

Als Gewebeprobe zur DNA-Isolierung wurden 2mm Schwanzspitze der zu genotypisierenden Tiere verwendet. Die Probe wurde mittels 1µl Proteinase K in 200 µl PBDN-Puffer bei 56°C unter konstantem Schütteln 4h lang hydrolysiert. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Zentrifugierung bei 13.800G und die Abpipettierung des DNA-haltigen Überstandes in ein zweites Reaktionsgefäß. Die weitere Aufreinigung der DNA wurde mittels des DNA-Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Dazu wurde der Überstand mit 100µl AL-Puffer gemischt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert, anschließend mit 100µl 100% Ethanol versetzt, abermals gemischt, und schließlich auf eine Filter-Säule aufgetragen. Diese wurde bei 5200G zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde 500µl AW1-Puffer auf die Säule gegeben, und, nach 1-minütiger Zentrifugierung bei 5200G, 500µl des AW2-Puffers hinzugefügt, woraufhin 3 Minuten mit 16.000G zentrifugiert wurde. Zur Elution der DNA wurden zweimal 150µl AE-Puffer auf die Filter-Säule gegeben, wobei jedesmal eine Inkubation über 5 Minuten mit anschließender 1-minütiger Zentrifugierung bei 5200G erfolgte. In den 300µl AE-Puffer des letzten Schrittes war nun die murine DNA der Gewebeprobe enthalten. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion

Der nächste Schritt der Genotypisierung bediente sich der Polymerase-Kettenreaktion, mit deren Hilfe sich einzelne Genabschnitte selektiv amplifizieren lassen. Dies geschieht mittels eines 3-stufigen Zyklus, der bei jedem Durchlauf zu einer Verdopplung und damit zu einer exponentiellen Vervielfältigung der einzelnen Genabschnitte führt. Bei wiederholtem Ablauf des Zyklus entsteht so rasch eine ausreichende Menge an DNA-Fragmenten für eine Auswertung mittels Gelelektrophorese.

Der erste Schritt des Zyklus stellt die Denaturierung dar, die bei 96°C erfolgt. Bei dieser Temperatur lösen sich die parallelen Doppelstränge der DNA-Doppelhelix voneinander, sodass die DNA nun in Einzelsträngen vorliegt. An diese lagern sich im nächsten Schritt, dem *Annealing* (Anlagerung), die Primer an, die den Startpunkt der Amplifikation des zu untersuchenden Genabschnitts darstellen. Da die Sequenzen der Primers komplementär zu den Basensequenzen ihrer Anlagerungsstellen am DNA-Einzelstrang sind, ist die Basensequenzen eines Primers für jedes Gen spezifisch.

Die Amplifikation erfolgt nun im dritten Schritt des Zyklus mit Hilfe einer DNA-Polymerase, die bei 72°C beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers Basen zu einem neuen, komplementären DNA-Fragment aneinanderreicht. Mittels eines programmierbaren

Heizblocks (Thermocycler), der die Temperaturstufen der drei Zyklen kontinuierlich wiederholt, erfolgt die Amplifikation der DNA-Fragmente schließlich automatisiert.

Die von uns gezüchteten Mäuse wurden nun hinsichtlich des Vorhandenseins des MDM2flox/flox- und des Cre-Recombinase-Genabschnitts untersucht. Dafür wurde ein Master Mix aus jeweils 2,5µl 10xPE-Puffer, 4,0µl 1,25mM dNTPs, 5µl PCR-Optimizer, 0,2µl hitzestabile Taq-Polymerase und 13,0µl H₂O hergestellt und mit 0,5µl der isolierten DNA vermischt. Für die Genotypisierung auf MDM2flox/flox wurden je 1µl 1:10 verdünnter MDM2-Fw-Primer und MDM2-WT-Rev-Primer dazugegeben, während das Vorhandensein der Cre-Recombinase mittels des Cre-Fw-Primers und des Cre-Rev-Primers, ebenfalls 1µl, 1:10 verdünnt, untersucht wurde. Zur Generierung eines Standard zur Auswertung der Banden der zu untersuchenden DNA wurden jeweils auch die DNA einer Wildtyp- und einer homozygoten Knockout-Maus amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit destilliertem Wasser anstelle von DNA verwendet.

Elektrophorese

Die Auswertung erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese. Die Gele bestanden aus 2g Agarosepulver pro 100ml TBE-Puffer, der bis zum Siedepunkt erhitzt wurde. Dann wurde 8µl Ethidiumbromid hinzugefügt, und die Mischung zum Auskühlen in einen mit Tascheneinsatz versehenen Gelbehälter gegossen. Nach Aushärtung wurde das Gel mit TBE-Puffer bedeckt und die Proben mit 4µl Ladepuffer vermischt. Neben einem DNA-Marker, der in die erste Geltasche gegeben wurde, wurden nun 8µl dieser Mischung in die übrigen Geltasche pipettiert und für 35 Minuten an eine Spannung von 200 Volt angeschlossen. Es kam zu einer Wanderung der DNA-Fragmente entlang des Spannungsgradienten und, aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente durch das Gel, zu einem Auftrennen gemäß ihrer Größe. Unter UV-Licht konnten die Banden nun sichtbar gemacht werden und ihre Größe anhand des DNA-Markers bestimmt werden. Durch Vergleich mit den Banden des Wildtyps und der homo- und heterozygoten Proben konnte nun der Genotyp bestimmt werden.

2.2.5 Urinabnahme

Einmal wöchentlich erfolgte die Urinabnahme. Dieser wurde in 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen und bei -20°C gelagert.

2.2.6 Blutabnahme

Ebenfalls wöchentlich erfolgte die Blutabnahme aus dem retrobulbären Venenplexus. Dafür wurde unter Isofluran-Kurznarkose eine Glaskapillare unter leichtem Drehen retrobulbär platziert. Das Blut wurde in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß mit 0,5µl 0,5-molarem EDTA aufgefangen und bei 8100G für 5 Minuten zentrifugiert. Der Plasma-Überstand wurde abpipettiert und bei -20°C gelagert.

2.2.7 Entnahme der Nieren

Die Versuchstiere wurden durch zervikale Dislokation euthanisiert. Nach medialer Laparotomie wurden die Nieren entnommen. Zur Isolation von Glomeruli erfolgte dies *en bloc* mitsamt den *Arteriae* und *Venae renalis*, der *Aorta abdominalis*, der *Vena cava* sowie dem umliegenden Gewebe. Die Isolation der Glomeruli erfolgte unmittelbar im Anschluss. Für histologische Zwecke erfolgte lediglich die Entnahme der Nieren, ohne umgebendes Gewebe oder zugehörige Gefäße. Nach Entnahme wurden die Nieren für 24h in 1,8%-Formalin eingelegt, bevor sie histologisch weiter verarbeitet wurden.

2.2.8 Isolation der Glomeruli

Die *en bloc* entnommenen Nieren wurden unter einem Mikroskop von ihrem umliegenden Gewebe frei präpariert. Die *Aorta*, die *Vena cava* und die Nierenarterien wurden dargestellt. Es erfolgte die longitudinale Eröffnung der *Aorta*, und die Sondierung der Nierenarterien mittels einer abgestumpften G20 Kanüle. Nun wurde die Nieren mit jeweils 1ml einer 10% Suspension aus gewaschenen M-450 tosylactivated Dynabeads und HBSS perfundiert (Abbildung 7).

Anschließend wurden die Nieren vom übrigen Gewebe separiert und ihre Kapsel entfernt. Mittels eines Skalpells und auf Eis erfolgte die Homogenisierung des Gewebes, welches bei 37°C für 30 Minuten mit 0,5ml Kollagenase A (1mg/ml) unter leichtem Schütteln angedaut wurde.

Auf Eis und mit einem Stempel wurde unter Spülen mit kaltem HBSS die Gewebemasse durch ein 100µm Zellsieb gedrückt. Die Suspension aus HBSS und Nierengewebe wurde nun bei 200G für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1ml HBSS gelöst und die Dynabeads-enthaltenden Glomeruli mittels eines magnetischen Zellseparators und unter dreimaligem Waschen mit kaltem HBSS von dem übrigen Nierengewebe getrennt. Die Quantität und Qualität der Isolation wurde mittels Lichtmikroskopie kontrolliert. Pro Maus ließen sich mit diesem Verfahren zwischen 10.000 und 15.000 Glomeruli gewinnen, wobei die Ausbeute in älteren Tieren größer war. Die für

RNA-Isolation bestimmten Glomeruli wurden in 500µl RNAlater-Lösung bei -20°C aufbewahrt, während die für Simulationsversuche bestimmten Glomeruli gleich nach Isolation in Zellkulturmedium überführt wurden, und die Glomeruli für Proteinisolation in RIPA-Buffer konserviert wurden.

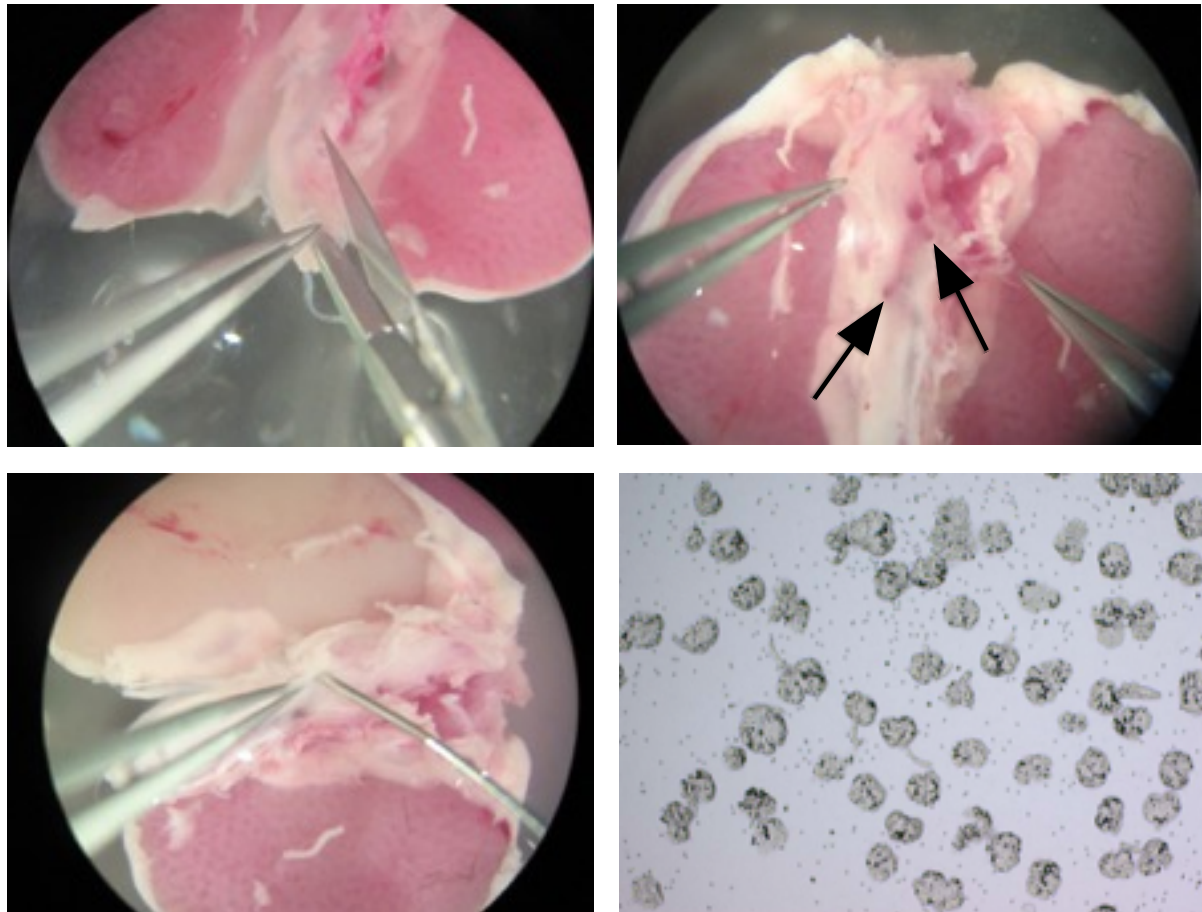


Abbildung 7: Glomerulus-Isolation. Die Aorta wird longitudinal eröffnet. Die schwarzen Pfeile zeigen die zu perfundierenden Lumen der Nierenarterien (obere Bildreihe). Nach Sondierung dieser erfolgt die Perfusion mit Dynabeads. Die erfolgreiche Perfusion erkennt man an dem Auswaschen des Blutes und der dadurch bedingten Aufhellung der Nieren (unten links). Murine Glomeruli mit Dynabeads (unten rechts).

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde ein PureLink RNA Mini Kit der Firma ThermoFisher verwendet. Etwa 10.000 Glomeruli wurden in 600µl Lyse-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol gegeben. Die Glomeruli wurden für 30 Sekunden homogenisiert und anschließend für 5 Minuten bei 12.000G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im Verhältnis 1:1 mit 70% Ethanol vermischt. Von dieser Mischung wurden nun 700µl auf eine RNA-Säule pipettiert und diese bei 12.000G für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 350µl Waschpuffer I auf die Säule gegeben. Erneut wurde bei 12.000G für 15 Sekunden zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Auffang-Röhrchen überführt und 2 mal mit jeweils 500µl Waschpuffer II gewaschen. Zwischen und nach dem Waschen wurde abermals zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die Membranen zu trocknen wurde als nächstes bei 12.000G für 2 Minuten zentrifugiert. Die RNA der Glomeruli haftete nun weitestgehend frei von Verunreinigungen in der Membran der RNA-Säule. Um die RNA daraus zu eluieren wurde die Säule in ein weiteres Eppendorf-Gefäß gegeben, 30µl RNase-freies Wasser mittig darauf pipettiert, für 1 Minute inkubiert und anschließend 2 Minuten mit 12.000G zentrifugiert. Die RNA war nun im Durchfluss gelöst. Die oben beschriebenen Schritte wurden wiederholt, bis die gesamte Mischung aus homogenisiertem Gewebe und Ethanol verarbeitet war.

Während den folgenden Schritten wurden die Proben auf Eis gelagert. Um sowohl die Qualität als auch die Quantität der gewonnen RNA zu bestimmen wurde die optische Dichte der Proben untersucht. Für die Bestimmung der Reinheit wurde die Absorption der gelösten RNA im Photometer bei 260nm und 280nm gemessen und der Quotient daraus gebildet. RNase freies Wasser diente als Kontrolle. Während für reine Proben ein Quotienten zwischen 1,7 und 2,0 erwartet wurde, lag bei Protein-Verunreinigungen der Quotient niedriger, bei DNA-Verunreinigungen jedoch höher. Die Menge der gewonnen RNA wurde über den Absorptionswert bei 260nm quantifiziert, mit dem die Konzentration an RNA in der Probe über folgende Formel bestimmt werden konnte: $\text{Absorption bei 260nm} \times 40 / 1000 = \text{Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die RNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.3.2 cDNA-Synthese

Um eine Aussage über die Genexpression in den zu untersuchenden Geweben zu treffen, musste die gewonnene RNA zunächst in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden, um diese cDNA mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion weiter zu analysieren.

Zum Umschreiben wurde 2 µg der isolierten RNA mit 10 µl DEPC-Wasser verdünnt und bei 65°C für 5 Minuten inkubiert. Dazu wurde 10 µl Komplettmix, bestehend aus 8 µl 5x Puffer, 0,8 µl 25mM dNTPs, 2 µl DTT, 0,5 µl linear-Acrylamide, 0,43 µl Hexanucleotide-Mix, 16,4 µl DEPC-Wasser, 1 µl RNasin und 0,87 µl Superscript II gegeben. Im Thermomixer wurden über 90 Minuten bei 42°C die cDNA-Fragmente amplifiziert und die Reaktion anschließend durch 5-minütiges Erhitzen auf 85°C gestoppt. Die Lagerung der gewonnenen cDNA erfolgte bei -20°C.

2.3.3 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative real-time polymerase chainreaction*, rt-qPCR) unterscheidet sich von der klassischen PCR dadurch, dass mittels der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten die Quantität der Fragmente in einer Probe bestimmt werden kann, und so Rückschlüsse auf das Maß der Expression der für die einzelnen Fragmente verantwortlichen Gene gezogen werden können. Die Amplifikation erfolgt dabei in 3 Schritten: zuerst wird die DNA denaturiert, indem die komplementären Stränge durch Erhitzen auf 95°C voneinander getrennt werden. Dann wird die Temperatur auf 60°C gesenkt, wobei es zum Anlagern der Primer an die komplementären DNA-Abschnitte kommt. Schließlich wird die Temperatur auf 72°C erhöht, worunter das hitzestabile Enzym Taq-Polymerase durch Aneinanderfügen von Hexanukleotid-Bausteinen einen zur cDNA komplementären Strang bildet. Abschließend erfolgt eine Fluoreszenz-Messung, und der Zyklus beginnt von neuem. Da die Menge der gebildeten DNA direkt proportional zur Fluoreszenz-Intensität ist, lässt sich mit deren Hilfe feststellen, wie groß der Anteil der gesuchten cDNA in der untersuchten Probe ist. Dazu wird gezählt, wie viele rt-qPCR-Zyklen es dauert, bis eine Probe über dem messbaren Fluoreszenz-Schwellenwert liegt. Wenn eine Probe von Beginn an einen hohen Anteil der untersuchten cDNA aufweist, dauert es weniger Zyklen, bis dieser Schwellenwert erreicht wird. Proben, die nach 40 Zyklen den Schwellenwert nicht erreichen, werden als nicht nachweisbar gewertet.

Die Anzahl der benötigten Zyklen der Proben werden zu den Werten einer Referenzsequenz ins Verhältnis gesetzt, womit eine relative Quantifizierung erfolgt. Als

Referenzsequenz verwendeten wir 18s, eine RNA die in allen eukaryotischen Zellen vorkommt und daher in allen Proben in gleichem Maße vorhanden war. Als Negativkontrolle wurden Proben mit destilliertem Wasser verwendet, die weder für 18s noch für das zu untersuchende Gen eine Fluoreszenz-Zunahme zeigen.

Für die Durchführung einer rt-qPCR benötigt man auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pro Näpfchen jeweils 0,6µl Forward- und Reverse-Primer für das zu untersuchende Gen, 1:10 in DEPC-Wasser verdünnt, 0,16µl des Enzyms taq-Polymerase, 0,4µl der zu analysierende cDNA, 8,24µl DEPC-Wasser und 10µl SYBR Green II Master Mix. SYBR-Green II Master Mix wird aus 2ml 10x taq-Puffer, 150µl 25 mM dNTPs, 4ml PCR Optimizer, 200µl Rinderserumalbumin (20ng/ml), 40µl SYBR Green II, 2,4mM MgCl₂ und 1,2ml H₂O hergestellt. SYBR-Green II bindet RNA und Einzelstrang-DNA, wodurch ein fluoreszierender Farbstoffkomplex entsteht. Die Intensität der Fluoreszenz wird mittels eines LightCyclers gemessen, der gleichzeitig den Temperaturverlauf der Amplifikationszyklen generiert, sodass die rt-qPCR automatisch erfolgt.

2.3.4 Protein-Isolation

Die Protein-Isolation erfolgte aus isolierten Glomeruli der MDM2-Knockouts und der Kontrollgruppe.

Die Glomeruli wurden dabei in 250µl RIPA-Buffer mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren überführt und 3 mal für jeweils 2 - 4 Sekunden mittels Ultraschall behandelt, wobei die Überhitzung der Proben durch stetige Kühlung verhindert wurde. Anschließend wurden die Proben für 2 Stunden bei 4°C einer konstanten Bewegung ausgesetzt. Nun wurde bei 10.000G für 20 Minuten ebenfalls bei 4°C zentrifugiert, im Anschluss der Überstand abpipettiert, in ein neues Reaktionsgefäß auf Eis überführt, und das Pellet verworfen. Die in den Proben enthaltene Proteinkonzentration wurde mithilfe der Bradford-Methode geschätzt. Dafür wurde zunächst ein Standard mit 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/ml erstellt und das Bradford-Reagenz 1:4 mit H₂O verdünnt. Nun wurden 1µl der Probe mit 9µl H₂O verdünnt und 200µl Bradford-Reagenz hinzugegeben. Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation gefolgt von der photometrischen Auswertung bei 590nm. Die Konzentration der verschiedenen Proben wurde nun mit H₂O angeglichen, pro 100µl Probe 25µl 4x-Proben-Puffer hinzugegeben und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Albumin Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Bei dem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) handelt es sich um ein enzymatisches Nachweisverfahren von Antigenen, z.B. Proteinen, Hormonen, Toxinen oder andere niedermolekulare Verbindungen. Das Prinzip des Testverfahrens beruht darauf, dass spezifische Antikörper ein Antigen, in unserer Untersuchung murines Albumin, binden. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, ebenfalls für das Antigen spezifischer Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, hinzugegeben. Nach Zugabe eines Substrates katalysiert dieses Enzym eine Farbreaktion. Mit Hilfe eines ELISA-Readers wird die durch die Farbreaktion bedingte Extinktion gemessen und so das in der Probe vorhandene Antigen quantifiziert.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten ELISA handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA, bei denen das gesuchte Antigen durch einen am Reaktionsgefäß hafteten Antikörper gebunden wird und erst im nächsten Schritt der Enzym-gekoppelte Antikörper hinzugegeben wird. So wird das Antigen zwischen den beiden Antikörpern wie in einem Sandwich gebunden.

Mit Hilfe des Bethyl-Laboratories Mouse Albumin ELISA Quantitation Sets wurde zunächst eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit Ziegen-anti-Mouse-Albumin Antikörper (*coating-antibody*) beschichtet, der sich an der Oberfläche der Näpfchen anlagerte. Dafür wurde der Antikörper 1:100 in dem Beschichtungs-Puffer verdünnt, jeweils 100µl dieser Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Vertiefungen 5 mal mit Wasch-Puffer gewaschen. Um ein Binden des zweiten, enzymgekoppelten Antikörpers an die nicht mit *coating-antibody* beschichteten Stellen der Vertiefungen zu verhindern, wurden in einem weiteren Schritt die freien Bindungsstellen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit 200µl Blockier-Puffer bedeckt. Der Blockier-Puffer enthält Rinderserumalbumin, das sich an die mit *coating-antibody* unbedeckten Stellen der Näpfchen anlagert und von dem enzymgekoppelten, für murines Albumin spezifischen Antikörpern nicht gebunden werden kann. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und 5-maligem Waschen wurden je 100µl der mit Probenverdünner verdünnten Proben bzw. Standards in die Vertiefungen gegeben. Bei dem Standard handelte es sich um eine Verdünnungsreihe mit bekannten Albumin-Konzentrationen von 1000µg/ml bis 7,5µg/ml. Außerdem wurden Leerproben mit Probenverdünner ohne Antigen aufgetragen. Sowohl Proben als auch Standards wurden in mindestens doppelter

Ausführung pipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation und abermals 5-maligem Waschen wurden je 100µl des mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish-peroxidase*, HRP) konjugierten Ziegen-anti-Mouse-Albumin Antikörpers in einer Verdünnung von 1:30.000 (Probenverdünner) in jede Vertiefung gegeben, für 60 Minuten inkubiert, und wieder 5 mal gewaschen. Anschließend wurde 100µl der Substratlösung in jede Vertiefung gegeben. Das Substrat Tetramethylbenzidin wurde nun von der antikörpergekoppelten Meerrettich-Peroxidase mit dem in der Substratlösung vorhandenen Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid umgesetzt. Dabei bildete Tetramethylbenzidin einen blauen Farbkomplex. Die Platte wurde für 10 bis 20 Minuten im Dunkeln inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war, und die Farbreaktion anschließend mit ELISA Stop Lösung (2N H₂SO₄) beendet. Das blaue Endprodukt der HRP-Reaktion bildete nun mit der Schwefelsäure einen stabilen, gelben Farbkomplex, dessen Absorption mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen wurde.

Zwischen der Absorption und der Quantität des in der Probe vorhandenen Albumins gibt es einen linearen Zusammenhang. Die Absorption ist umso stärker, je mehr Albumin in der Probe enthalten ist. Wird viel Albumin von den *coating-antibodies* gebunden, stehen im nächsten Schritt dementsprechend mehr Bindungsstellen für den Albumin-spezifischen, enzymgekoppelten Antikörper zur Verfügung. So ist eine größere Menge HRP vorhanden, um im nächsten Schritt die Farbreaktion zu katalysieren, und die Absorption wird stärker. Nach der Messung wurde anhand des Albumin-Standards eine Kurve erstellt, mit der die Albumin-Konzentration in den Probe bestimmt wurde.

2.4.2 Kreatinin-Messung

Für die Serum-Kreatinin-Messung wurde die Jaffé-Methode angewandt. Dabei wird einer kreatininhaltigen Probe Pikrinsäure hinzugefügt, woraufhin sich in einer alkalischen Lösung ein gelb-oranger Farbkomplex aus Pikrinsäure und Kreatinin bildet.

Zur Messung wurde ein Kreatinin-Kit der Firma DiaSys verwendet. Dazu wurden jeweils 10µl der Probe beziehungsweise des Standards in ein Nöpfchen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Reagenz 1 und Reagenz 2 des Sets wurden im Verhältnis 4:1 gründlich gemischt. Von dieser Mischung wurde 90µl in jedes Proben- und Standardnöpfchen pipettiert. Die Quantifizierung erfolgt durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 492nm 30 und 60 Sekunden nach Zugabe des gemischten Reagenzes. Für die Auswertung wurde die Differenz der Absorption zwischen 60 Sekunden und 30 Sekunden berechnet, und mithilfe der Standards der Kreatiningehalt der Proben bestimmt.

Damit die Messwerte im Bereich der Standardwerte lagen, wurden die Serumproben vor Messung im Verhältnis 1:10 mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. Die Messung sowohl der Proben als auch der Standards erfolgte stets in doppelter Ausführung.

2.4.3 Western-Blot

Der quantitative Nachweis verschiedener Proteine erfolgte mittels Western-Blot, wobei es sich um eine Methode handelt, die Elektrophorese mit einem immunologischen Nachweis kombiniert. Für die Elektrophorese wurden 10-prozentige Agarose-Gele mit ca. 1,5cm *Stacking-Gel* gegossen, die in eine Kammer umgeben von *Running-Buffer* gegeben wurden. Alle Taschen wurden mit dem gleichen Volumen beladen, wobei Proben und Standards mindestens doppelt ausgeführt wurden. Nun wurde für etwa 30 Minuten zunächst eine konstante Spannung von 100 Volt angelegt, die, nachdem die Proben das *Stacking-Gel* durchlaufen hatten, auf 150 Volt erhöht wurde, worunter die Proben etwa 2 Stunden lang separiert wurden. Als nächstes erfolgte der Transfer der Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran. Für wurde das Gel zunächst in Transfer-Puffer überführt. Die Membran wurden zur Vorbereitung erst in Methanol und dann in Transfer-Puffer eingelegt. Die Membran wurde nun auf 4 - 5 Lagen Filter gelegt, das Gel wurde auf die Membran transferiert, und ebenfalls von 4 - 5 Lagen Filter bedeckt. Bei einer Spannung von 15 Volt erfolgte nun der Transfer der Proteine auf die Membran.

Um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurde die Membran anschließend über eine Stunde in TBST mit 5% Magermilchpulver geblockt. Dann wurde sie über Nacht in eine 50ml Reaktionsgefäß mit ca. 5ml des mit TBS 1 : 1.000 verdünnten primären Antikörpers gegeben und konstant bewegt, sodass die gesamte Membran gleichmäßig von dem Antikörper benetzt wurde. Danach wurde die Membran 3 mal für jeweils 10 Minuten mit TBST gewaschen, und anschließend mit dem 1 : 20.000 verdünnten sekundären Antikörper für eine Stunde inkubiert. Erneut wurde im Anschluss 3 mal für jeweils 20 Minuten mit TBST gewaschen. Abschließend erfolgte durch Zugabe der Substrate des sekundären Antikörpers die Belichtung der Filmfolien, die anschließend entwickelt wurden. Danach wurde die Membran für 20 Minuten in TBST gewaschen, für 5 Minuten mit Stripping-Puffer inkubiert und abermals für 20 Minuten gewaschen. Nun konnte die Membran mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden. Als Loading-Kontrolle wurde β -Actin verwendet.

2.5 Histologische Methoden

2.5.1 Histologische Schnitte

Sowohl für die Analyse des Nierenparenchyms hinsichtlich strukturellen Veränderungen, als auch zur Untersuchung der MDM2-Expression in den Podozyten und zur Quantifizierung derer wurden histologische Schnitte mikroskopisch unter 100x und 400x Vergrößerung ausgewertet.

Zur Fixierung wurden die entnommenen Organe zunächst über 24 Stunden in 4% Formalin eingelegt. Nach Behandlung mit Xylol erfolgte anschließend die Einbettung in Paraffin. Von diesen Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom 4 μ m dicke Schnitte angefertigt, die auf Objektträger übertragen und getrocknet wurden. Diese wurden danach erst mit Xylol und anschließend mit Alkohol in absteigenden Konzentrationen (100%, 96%, 70%, 50%) entparaffiniert und schließlich gespült.

2.5.2 Färbungen

Periodic Acid Schiff Färbung

Die *Periodic Acid Schiff* (PAS)-Färbung wurde für die Analyse des Nierengewebes hinsichtlich struktureller Veränderungen verwendet. Nach Deparaffinisierung und Rehydrierung wurden die Schnitte zunächst für 10 Minuten in *Periodic-Acid*-Lösung gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurde für 20 Minuten mit Schiff-Reagenz inkubiert, und nach einem weiteren Waschgang wurden die Objektträger für 2 Minuten mit Kalium-Methabisulfid-Lösung bedeckt. Nach Ablauf der Zeit wurde diese entfernt und durch Fixierlösung ersetzt. Dieses verblieb für 2 Minuten auf den Schnitten und wurde anschließend abgewaschen. Nun wurden die Schnitte für 3 Minuten mit Mayer's Hemalum-Reagenz benetzt, welches anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen wurde. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden nun mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und abschließend mit Xylol aufgehellt und mit Deckgläschen verschlossen.

Silberfärbung

Für die Silberfärbung wurden 2 μ m-Paraffinschnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und für 5 Minuten in destilliertem Wasser rehydriert. Nun wurden die Schnitte für 15 Minuten in 1% Periodsäure gegeben, anschließend für 5 Minuten

gewaschen und dann 5 Minuten mit 0,5% Thiosemicarbazid-Lösung behandelt, woraufhin wieder für 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Danach wurden die Schnitte für etwa 10 Minuten in auf 63°C erwärmte Silberlösung (aus 55ml Stock-Methenamin-Lösung, 2,8ml Stock-Silber-Lösung und 6,6ml Stock-Natrium-Borat-Lösung) gegeben, wobei sich bei der Dauer nach der Signalintensität gerichtet wurde. Anschließend wurde kurz gespült, und die Schnitte dann für 15 Minuten in Gold-Chlorid-Lösung gegeben. Nun wurden die Schnitte wieder kurz gewaschen, und dann für 1 Minute mit Hydrogennitrat-Formaldehyd-Lösung behandelt, woraufhin sie zweimal gewaschen und dann 10 Minuten in der Natrium-Borat-Lösung fixiert wurden. Nach Fixation erfolgte 2-minütiges Waschen, gefolgt von 2-minütiger Behandlung mit Hematoxylin-Lösung. Nun wurde für 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen, und die Schnitte dann 10 mal in Eosin getaucht. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden nun mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, und abschließend mit Xylol aufgehellt und eingedeckelt.

Immunfluoreszenz

Für immunhistochemische Färbungen wurden 2µm-Paraffinschnitte entparaffiniert, rehydriert und mit zweimal für 7 Minuten mit PBS gewaschen. Zum Freilegen der Antigene wurden die Schnitte in eine Mischung aus 3ml Antigen-Unmasking-Lösung und 300ml H₂O gegeben und in einer Mikrowelle 4 mal für 2,5 Minuten erhitzt. Erneut wurde 2 mal für 7 Minuten in PBS gewaschen. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, erfolgte das Blocken des in den Schnitten enthaltenen Biotins mittels Avidin für 15 Minuten, gefolgt von kurzem Waschen und einer 15-minütigen Inkubation mit Biotin, woraufhin wieder zweimal mit PBS für jeweils 7 Minuten gespült wurde.

Nun wurde auf jeden Gewebeschnitt 50µl - 100µl des 1:100 mit PBS verdünnten Anti-mouse-Nephrin-Antikörpers gegeben und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde für 7 Minuten gewaschen. Nun wurden 50µl - 100µl des 1:100 verdünnten Anti-pig-Alexa-488-Antikörpers hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert, woraufhin wieder zweimal mit PBS für jeweils 7 Minuten gespült wurde. Nun wurde auf die Gewebeschnitte 50µl-100µl des 1:25 verdünnten Anti-mouse-WT1-Antikörpers gegeben und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde wieder für 7 Minuten gewaschen. Nun wurden 50µl-100µl des 1:200 verdünnten sekundären Anti-Kaninchen-Cy3-Antikörpers hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert, woraufhin wieder zweimal mit PBS für jeweils 7 Minuten gespült wurde. Zum Schluss wurde ein Tropfen VectaMount hinzugegeben und die Gewebeschnitte mit Deckgläschen verschlossen.

Immunhistochemie

Für immunhistochemische Färbungen wurden 2µm-Paraffinschnitte entparaffiniert, rehydriert und mit zweimal für 7 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die in den Schnitten enthaltenen endogene Peroxidase in einer Mischung aus 20ml 30% H₂O₂ und 180ml Methanol über einen Zeitraum von 20 Minuten geblockt, und anschließend abermals mit zweimal für 7 Minuten mit PBS gewaschen. Zum Freilegen der Antigene wurden die Schnitte in eine Mischung aus 3ml Antigen-Unmasking-Lösung und 300ml H₂O gegeben und in einer Mikrowelle 4 mal für 2,5 Minuten erhitzt. Erneut wurde 2 mal für 7 Minuten in PBS gewaschen. Nachdem die Schnitte abgekühlt waren, erfolgte das Blocken des in den Schnitten enthaltenen Biotins mittels Avidin für 15 Minuten, gefolgt von kurzem Waschen und einer 15-minütigen Inkubation mit Biotin, woraufhin wieder zweimal mit PBS für jeweils 7 Minuten gespült wurde.

Um nichtspezifische Bindungen des sekundären Antikörper zu vermeiden, wurden die Schnitte nun für 10 Minuten mit 10% Ziegen-Serum inkubiert. Nun wurden die Schnitte mit den primären MDM2- (1:800) und p53-Antikörpern (1:500) entweder eine Stunde bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C inkubiert, und anschließend 7 Minuten mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen-Biotin), die 1:300 in PBS verdünnt waren, abermals gefolgt von einem 7-minütigen PBS-Waschvorgang. Nun wurde die ABC-Substratlösung (15µl Reagenz A und 15 µl Reagenz B zu 1ml PBS) der sekundären Antikörper hinzugefügt, für 30 Minuten inkubiert, und anschließen wieder mit PBS gewaschen. Gleich darauf wurde nochmal mit TRIS-Hydrochlorid für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurde mit der DAB-Lösung für 1 bis 10 Minuten gefärbt, wobei die Intensität mikroskopisch kontrolliert wurde. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit Methylgrün. Nun wurden die Schnitte 2 mal für 10 Sekunden in 96% Ethanol gewaschen, gefolgt von 3-maligem Waschen für jeweils 10 Sekunden in 100% Ethanol. Zum Schluss wurde ein Tropfen VectaMount hinzugegeben und die Gewebeschnitte mit Deckgläschen verschlossen.

2.5.3 Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die entnommen Nieren in 1mm große Würfel zerkleinert, und über Nacht in Fixationslösung (PBS mit 1% Glutaraldehyd und 2% Paraformaldehyd) gegeben. Danach wurden sie in Kakodylsäure mit 2% Glutaraldehyd und 2% Paraformaldehyd (pH7.4) überführt. Die Fixation wurde durch 1-stündige Inkubation in Kakodylsäure mit 2% OsO₄ abgeschlossen. Anschließend erfolgte die Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, welche mit Propylenoxid und Embed-812 abgeschlossen wurde. Danach wurden die Gewebewürfel eingebettet, und im Anschluss Schnitte mit einer Dicke von etwa 90nm angefertigt. Diese wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat angefärbt und mit einem 1200EX Elektronenmikroskop der Firma JEOL ausgewertet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Prof. Dr. Helen Liapis an der Washington University in St. Louis, Missouri, USA, durchgeführt.

2.6 *in vitro* Methoden

2.5.1 Kultur der Podozyten-Zelllinie

Für die Simulationsversuche wurden immortalisierten Podozyten wie beschrieben [171] bei 33°C und einer CO₂-Konzentration von 5% in mit Kollagen beschichteten Petrischalen kultiviert. Es wurde RPMI1640 Medium mit folgenden Zusätzen verwendet:

- 10% fetales Kälberserum (FBS)
- 1% Penicillin/Streptomycin (P/S)
- 1 mmol/l Sodiumpyruvat
- 10 mmol/l HEPES
- 1 mmol/l Sodiumbicarbonat

Zur Kultivierung wurde dem Zellmedium (siehe Material) IFN (Interferon)- γ in einer Konzentration von 50u/ml zugesetzt. Der Wechsel des Mediums erfolgte 3 mal wöchentlich. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen in den Petrischalen nicht konfluent wurden. Das Splitten der Zellen erfolgte gemäß einem gängigen Protokoll unter Zuhilfenahme von Trypsin/EDTA und mehreren Waschschritten. Vor Rekultivierung wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zellkammer gezählt, und im Anschluss etwa 50.000 Zellen pro 10cm² ausplattiert.

Zur Differenzierung wurden die Podozyten über ca. 15 Tage ohne IFN- γ bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert, wobei sich die Morphologie der Zellen von rundlich (*cobblestone-like*) zu verzweigt (*arborized*) änderte, und damit dem vorbeschriebenen Prozess der Differenzierung entsprach [60].

2.6.2 Stimulation von Podozyten

Für die Simulationsversuche wurden entweder 14 Tage lang ausdifferenzierte Zellen der Podozyten-Zelllinie verwendet, oder Glomeruli wie oben beschrieben mittels Dynabead-Perfusion aus 4 Wochen alten C57BL/6-Mäusen isoliert. Während die Podozyten aus Zellkultur in ihren Kulturgefäßen belassen und gleich stimuliert wurden, wurden die isolierten Glomeruli zunächst in Zellkulturplatten (pro Loch einer 6-Loch-Zellkulturplatte ca. 2000 Glomeruli mit 2ml Medium) mit RPMI-Zellkulturmedium mit 10% FBS und 1% P/S in zuvor mit Kollagen beschichtete Kulturgefäße ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Nach 2 Tagen wurde das Medium mitsamt den nicht-adhären Glomeruli entfernt. Die adhären Glomeruli wurden mittels mehrmaligem Spülen mit kaltem PBS entfernt. Für den Versuch wurden 5 Gruppen gebildet, die folgendermaßen stimuliert wurden:

- 1) Medium (RPMI, 10% FBS, 1% P/S)
- 2) Medium + 1 μ l/ml Nutlin
- 3) Medium + 1 μ l/ml Pam3C
- 4) Medium + 1 μ l/ml Nutlin + 1 μ l/ml Pam3C
- 5) Medium + 20 μ l/ml Triton-X-100

Bei Nutlin handelt es sich um einen MDM2-Antagonisten, was zu einer Suppression der MDM2-Wirkung führt, und Pam3c ist ein TLR (Toll Like Rezeptor) 2 -Agonist, der zu einer Aktivierung der Zellen und zu einer Immunantwort führt, wie sie beispielsweise bei Entzündungs- oder Infektionsvorgängen auftreten kann.

Mithilfe eines Lichtmikroskops wurden Fotos der von den Glomeruli ausgehenden Zellpopulationen angefertigt. Die Aufnahmen von Tag 0 (Tag der Stimulation) und Tag 3 nach Stimulation wurden bezüglich der Fläche der adhärennten Zellkulturen verglichen. Zusätzlich wurde ein LDH-Assay des Überstandes nach 12h, 24h und 72h durchgeführt.

2.6.3 Lactatdehydrogenase-Assay

Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitär vorkommendes, obligat intrazelluläres Enzym, welches am Energiestoffwechsel beteiligt ist. Der LDH-Assay beruht auf einem enzymatisches Nachweisverfahren von LDH, welches nach Ruptur der Zellmembran aus zugrundehenden Zellen freigesetzt wird, und somit beispielsweise in Zellkulturmedium nachweisbar wird. Der LDH-Assay eignet sich daher zur Quantifizierung von Zelluntergang *in vitro*.

Untersucht wurde sowohl das Zellkulturmedium einer Podozyten-Zelllinie als auch das Medium von aus isolierten Glomeruli aussprossenden Zellen, die vorher wie oben beschrieben stimuliert wurden. Dafür wurden zunächst jeweils 250 μ l des zu untersuchenden Überstandes abgenommen und für 10 Minuten bei 25G zentrifugiert. Je 100 μ l dieses Überstandes wurden in eine Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben, wobei sowohl Proben als auch Kontrollen mindestens doppelt aufgetragen wurden. Zu dem Überstand wurden nun 100 μ l der vorbereiteten Reaktionslösung des LDH-Kits (Roche) gegeben, und für 15 bis 30 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Die Auswertung erfolgte schließlich mittels einer Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 492nm.

2.7 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) angegeben. SEM wird in den Abbildungen mithilfe der Fehlerbalken dargestellt.

Die statistischen Signifikanz wurde mithilfe des zweiseitigen Student's t-Test berechnet, wobei ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen und mit * markiert wurde.

Überlebensraten wurden in Form einer Überlebenskurve nach Kaplan-Meier dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Cre/loxP MDM2-Knockout vermindert MDM2-Expression in Podozyten

Nach Kreuzung der Mäuse mit gefloxtem MDM2-Gen mit Tieren, in denen die Cre-Recombinase unter Kontrolle des Podocin-Promotors exprimiert wurde, erfolgte die Genotypisierung mittels *real-time* PCR. Nach Sicherung des Genotyps sollte untersucht werden, ob die Cre-Recombinase den für MDM2 kodierenden Abschnitt auch wie gewünscht aus dem Genom der Podozyten entfernte, das heißt ob das Cre/loxP-System auch in diesem Modell erfolgreich funktionierte.

Dafür wurde zunächst die MDM2-mRNA-Expression in isolierten Glomeruli untersucht. Dazu isolierten wir Glomeruli aus den Nieren 10 Wochen alter Kontroll- und Versuchstiere. Nach RNA-Isolation erfolgte mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion die Quantifikation der Unterschiede bezüglich MDM2-Genexpression bzw. bezüglich der Höhe der MDM2-mRNA-Spiegel. Für die Untersuchung wurden die Werte der isolierten MDM2-mRNA von MDM2 Δ Podozyt Mäusen mit den Werten der Kontrollgruppe verglichen (Abbildung 8 A). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Werte der Kontrolle auf 100% festgesetzt. Bei den Messungen fand sich in den Tieren mit ausgeknocktem podozytärem MDM2-Gen ein signifikant verminderter Spiegel von MDM2-mRNA in den isolierten Glomeruli. Es wurde lediglich Werte von 53% des Spiegels der Kontrollgruppe gemessen, was einer Verminderung der Expression um 47% entspricht. Der Knockout führt also dazu, dass MDM2 Δ Podozyt Mäuse geringere Mengen an MDM2-mRNA in den Glomeruli aufweisen. Um die unterschiedliche Genexpression zu bestätigen, erfolgte im nächsten Schritt die Anfertigung eines Westernblots mittels Proteinisolation aus Glomeruli 10 Wochen alter MDM2 Δ Podozyt Mäusen sowie deren Kontrolle (Abbildung 8 B). Die deutlich schwächere MDM2-Bande der KO-Gruppe bestätigten dabei die bereits in der qPCR gemachten Beobachtungen, dass MDM2 weniger stark exprimiert, und somit auch weniger stark translatiert wurde. Als Loading-Kontrolle wurde β -Actin verwendet.

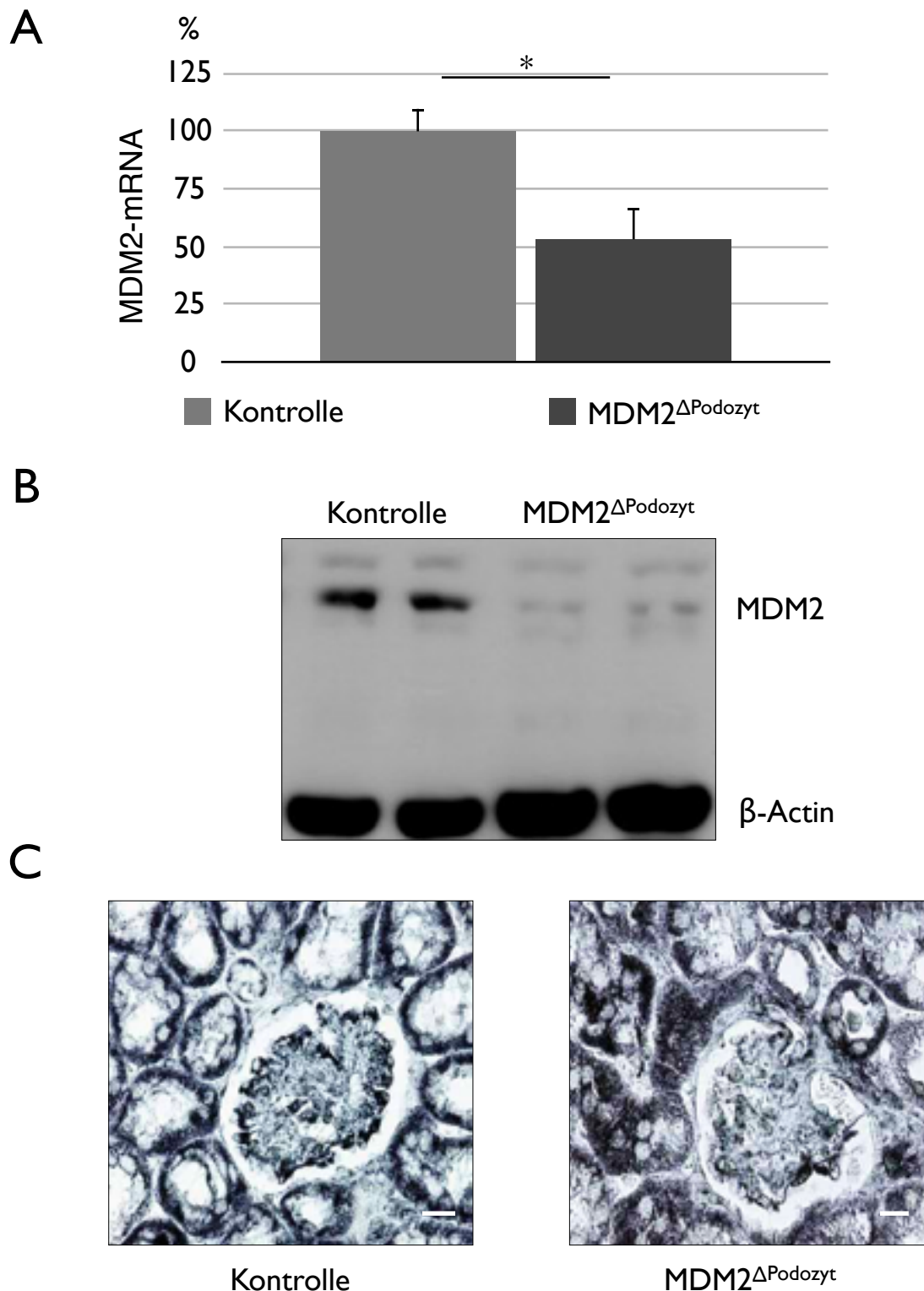


Abbildung 8: MDM2 ist durch Knockout erfolgreich vermindert. A: MDM2-mRNA aus Glomeruli 10 Wochen alter Tiere zeigt im Vergleich zur Kontrolle auf 53% signifikant verringerter MDM2-mRNA-Spiegel. Fehlerbalken zeigt \pm Standardfehler. * = $p < 0,005$. B: Der Westernblot aus Glomeruli 10 Wochen alter Tiere zeigt verminderte Spiegel von MDM2 in der Knockout Gruppe. C: In MDM2 Δ Podozyt Mäuse zeigt sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduzierte MDM2-Färbung der Podozyten. Die Balken entsprechen 20 μ m.

Da sowohl qPCR, als auch der Western-Blot mit verminderter MDM2-Banden der Versuchstiere auf einen erfolgreichen Knockout hinwiesen, versuchten wir als nächstes die Ergebnisse mittels Immunhistologie zu bestätigen. Dazu wurden mit MDM2-Antikörpern histologische Schnitte von Nieren 8 Wochen alter MDM2 Δ Podozyt Mäuse sowie von Kontrollen gefärbt (Abbildung 8 C). Während die MDM2 Δ Podozyt Mäuse ohne Podocin-Cre eine gut erkennbare MDM2-Färbung in den für Podozyten typischen Bereichen der Glomeruli aufwiesen, war in den MDM2 Δ Podozyt-Tieren in diesen Bereichen kein MDM2-Signal feststellbar. In den übrigen Bereichen, beispielsweise dem Tubulusepithel oder den Mesangialzellen, zeigte sich zwischen den beiden Gruppen keine unterschiedliche Anfärbbarkeit.

Sowohl die Ergebnisse der qPCR, als auch des Westernblots und der Immunhistologie bestätigten, dass der Knockout nicht nur genotypisch erfolgreich war, sondern dass die Versuchstiere auch wie gewünscht eine unterdrückte MDM2-Expression in den Podozyten aufwiesen. Da MDM2 der Hauptnegativregulator des Tumorsuppressors p53 ist, untersuchten wir als nächstes, ob die erniedrigten MDM2-Spiegel eine Erhöhung der p53-Spiegel zur Folge hatten.

3.2 MDM2-Knockout führt zu erhöhter p53-Expression in Podozyten

Da eine der Hauptfunktionen von MDM2 die Negativregulation von p53 ist, untersuchten wir als nächstes, ob die erniedrigten MDM2-Spiegel eine Auswirkung auf die p53-Spiegel nach sich ziehen.

Dafür erfolgte die p53-Färbung von Nierenschnitten 3 bis 14 Wochen alter Versuchstiere. Es zeigte sich, dass sich in den p53-gefärbten Schnitten 3 Wochen alter MDM2 Δ Podozyt Mäuse keine im Vergleich zur Kontrolle verstärkte Anfärbbarkeit für p53 feststellen ließ (Abbildung 9). Im Verlauf kam es allerdings zu einer progredient ansteigenden Anfärbbarkeit; während 14 Wochen alte Kontrolltiere eine mit 3 Wochen alten Tieren vergleichbare schwache Anfärbbarkeit für p53 zeigten, erkannte man in den 14 Wochen alten MDM2 Δ Podozyt Mäusen eine deutliche p53 Färbung.

Da Podozyten also durch den MDM2-Knockout verstärkt den Einflüssen von p53 ausgesetzt waren, wurde anschließend anhand der Expression verschiedener Podozyten-spezifischer Gene untersucht, welche Auswirkungen die erhöhten p53-Spiegel auf die Podozyten der Versuchstiere hatten.

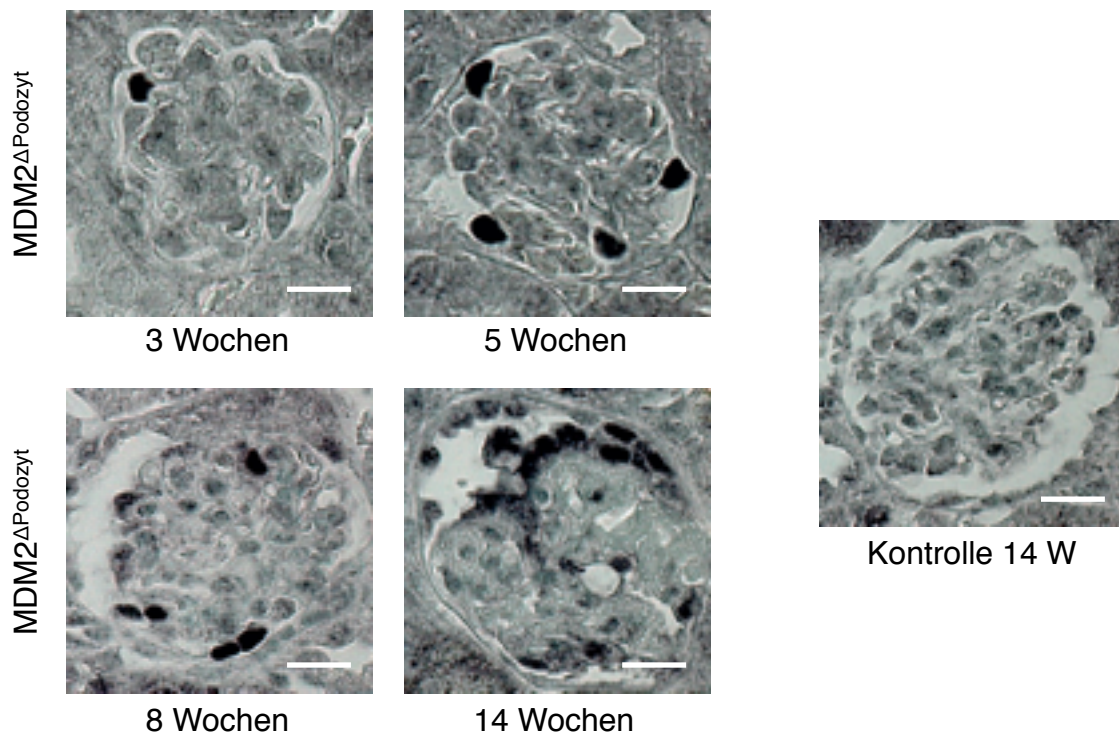


Abbildung 9: Glomeruli, p53-gefärbt. Bei der Podozyten-MDM2-defizienten Gruppe ist eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich intensiverer p53-Färbung erkennbar, die im Zeitraum zwischen 3 und 14 Wochen an Intensität zunimmt (4 Bilder links). Die Kontrolle zeigt auch im Alter von 14 Wochen keine deutliche Anfärbbarkeit für p53 (rechtes Bild). Die Maßstabsbalken zeigen 20 μ m.

3.3 MDM2-Knockout vermindert die Expression Podozyten-spezifischer Gene

Um die Auswirkungen des MDM2-Knockouts und den damit verbundenen erhöhten p53-Spiegeln auf die Podozyten zu untersuchen, wurde die Expression zweier Podozyten-spezifischer Gene in aus Glomeruli gewonnener mRNA zwischen den Knockouts und der Kontrollgruppe im Alter von 10 Wochen mittels qPCR verglichen.

Podocin ist ein Protein, das ausschließlich in Podozyten vorkommt, und an der Bildung der Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen benachbarten Podozyten beteiligt ist [64]. Synaptopodin hingegen findet sich nicht nur in Podozyten, wo es für die Stabilität der Zellen verantwortlich ist, sondern auch in bestimmten Bereichen des Gehirns [172]. Da glomeruläre mRNA untersucht wurde, hatte das Vorkommen von Synaptopodin im Gehirn keine Auswirkung auf die Ergebnisse unserer Untersuchung.

Es zeigte sich, dass in der Gruppe der Knockouts sowohl die Spiegel für Podocin-mRNA als auch die Spiegel für Synaptopodin signifikant geringer waren als in der Kontrollgruppe (Abbildung 10). Die Podocin-mRNA war im Vergleich um 73% auf 27% vermindert, die Synaptopodin Expression betrug 18% des Wertes der Kontrollgruppe. Der Knockout mit verminderten MDM2-Spiegeln, die wiederum eine Erhöhung der p53-Spiegel nach sich ziehen, greift demnach in physiologische Prozesse der Podozyten ein.

Inwiefern dies das Überleben der Podozyten beeinträchtigt, untersuchten wir mittels Quantifikation der Podozytenpopulationen in Versuchs- und Kontrolltieren.

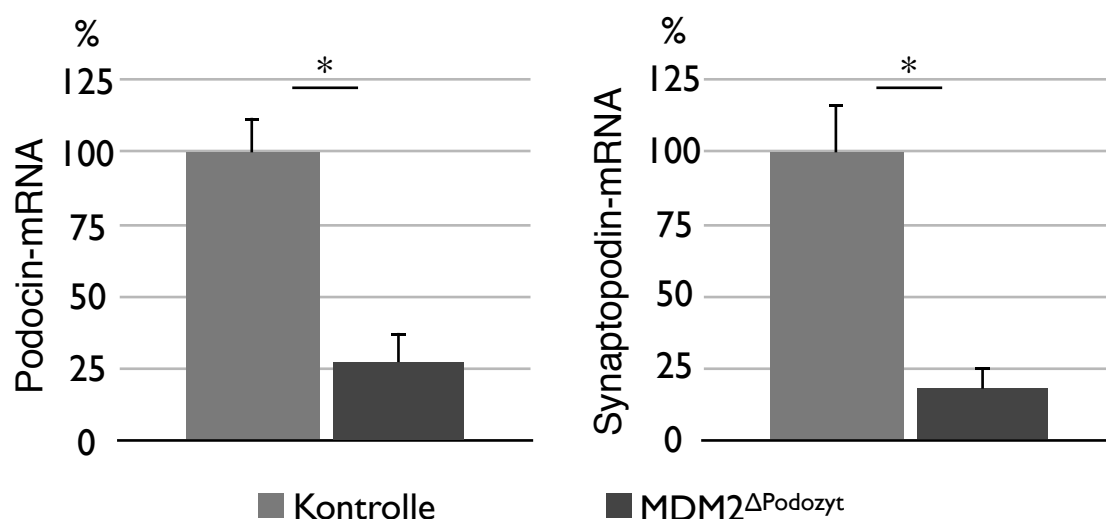


Abbildung 10: Expression Podozyten-spezifischer Gene. Im Alter von 10 Wochen zeigt sich eine signifikant verminderte Expression von Podocin und Synaptopodin (* = $p < 0,005$) bei den Knockout-Mäusen. Werte in %, die mRNA Werte der Kontrolle wurden auf 100% festgesetzt. Die Diagramme stellen Mittelwerte aus 7 Tieren pro Gruppe dar. Fehlerbalken zeigen \pm Standardfehler.

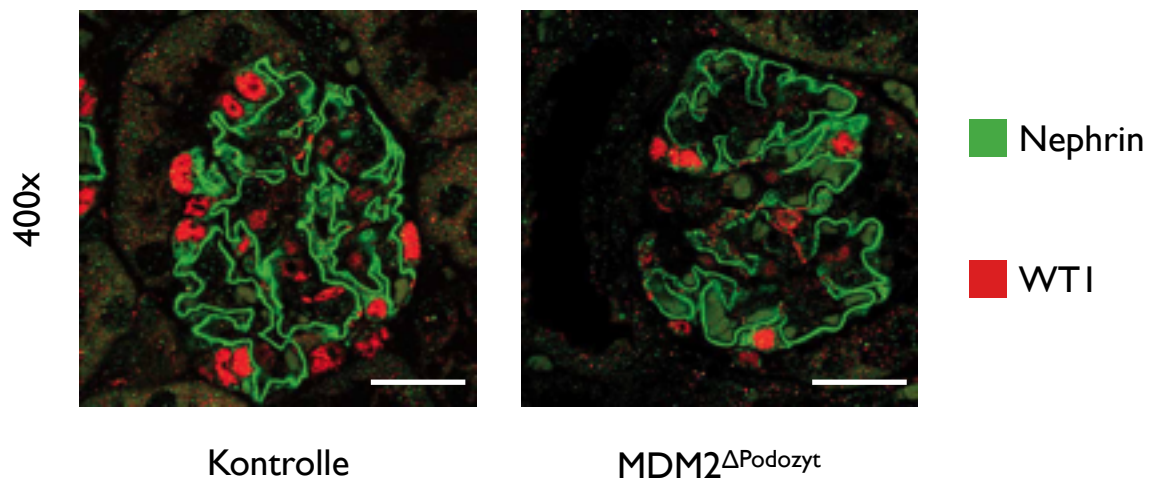
3.4 MDM2-Knockout führt zu Podozytenverlust

Nachdem gezeigt wurde, dass es in dem Knockout zur verminderten Expression Podozyten-spezifischer Gene kommt, untersuchten wir nun, ob dies mit einer Änderung der Podozytenzahlen korrelierte. Dafür wurden immunhistologische Nierenschnitte von Kontroll- und MDM2^{ΔPodozyt} Mäuse im Alter von 3 und 14 Wochen ausgewertet, die mit fluoreszierenden Antikörpern gegen Wilms-Tumor-Protein-1 (WT1) und Nephrin gefärbt waren. WT1 wurde hierbei als Marker für Podozyten-Nuclei verwendet. Da WT1 allerdings auch in PECs nachgewiesen werden kann, erfolgt die Co-Färbung mit Nephrin (Abbildung 11A). Nephrin findet sich in den Glomeruli hauptsächlich in der Schlitzmembran der glomerulären Filtrationsbarriere [173], sodass Zellen, die eine positive Färbung für WT-1 aufweisen und unmittelbar an Nephrin-positiv gefärbten Arealen liegen, als Podozyten identifiziert werden können. Dabei handelt es sich um ein etabliertes Verfahren, dass bereits in anderen Arbeiten erfolgreich angewendet werden konnte [174].

Bei den 3 Wochen alten Tieren fand sich zwischen der Kontrollgruppe und den MDM2-Knockouts kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Podozyten-Nuclei in den ausgezählten Glomeruli. Dies zeigt, dass die Mäuse beider Gruppen mit einer nahezu gleichen Anzahl an Podozyten geboren wurden und diese auch über die ersten Lebenswochen erhalten bleiben. Bei dem Auszählen der Glomeruli der 14 Wochen alten Tiere wurde jedoch deutlich, dass nun die MDM2^{ΔPodozyt}-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant weniger Podozyten-Nuclei pro ausgezähltem Glomerulus aufwiesen (Abbildung 11B). Die Anzahl der ausgezählten Nuclei in der Kontrolle stieg gegenüber dem 3-wöchigen Zeitpunkt sogar leicht an, was auf die Größenzunahme der Nieren und damit auch der Glomeruli im Rahmen des physiologischen Wachstums der Mäuse in dem Zeitraum zwischen 3 und 14 Wochen zurückgeführt wurde. Da beide Gruppen im Alter von 3 Wochen die gleiche Anzahl an Podozyten aufwiesen, wurde die Abnahme der gezählten Nuclei in den MDM2^{ΔPodozyt}-Mäusen auf einen Verlust von Podozyten zurückgeführt. Da das einzige Unterscheidungsmerkmal beider Gruppen in dem Ausmaß der Expression von MDM2 in den Podozyten lag, wurde von einem kausalen Zusammenhang zwischen der supprimierten MDM2-Expression und dem Verlust von Podozyten ausgegangen.

Da Podozyten eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Nierenfunktion haben, wurde als nächstes die Auswirkungen des Podozytenverlustes auf diese untersucht.

A



B

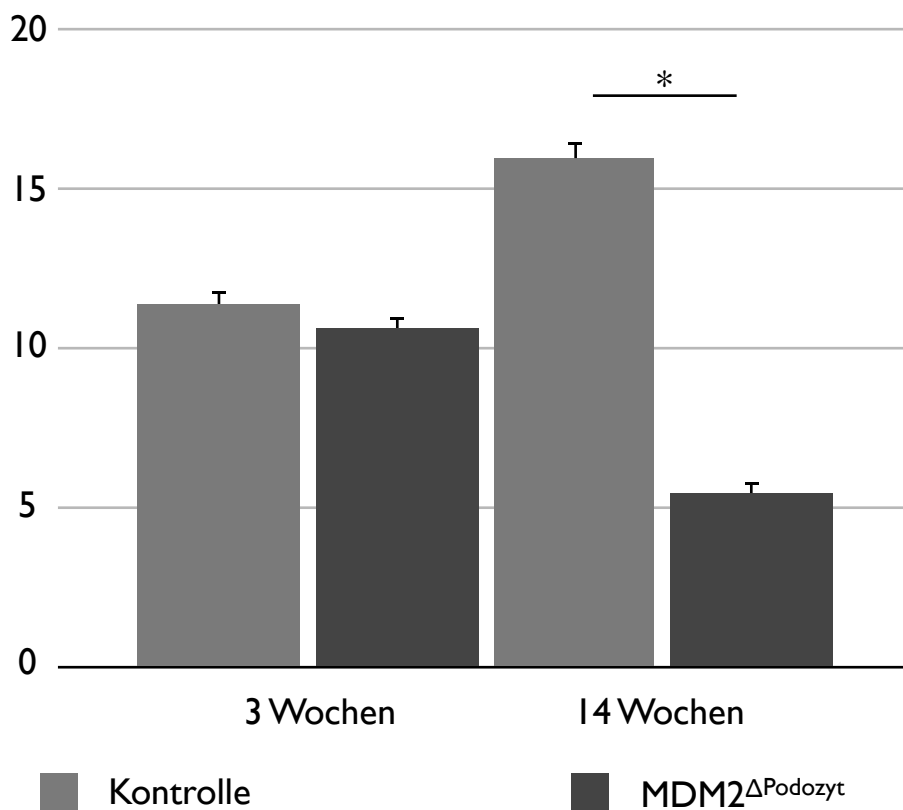


Abbildung 11: Podozytenverlust in MDM2 Δ Podozyt Mäusen. A: Nierenschnitte, 14 Wochen, WT1/Nephritin Färbung. In den Knockouts sind deutlich weniger Areale erkennbar, die sowohl mit WT1- als auch Nephritin-Antikörpern gefärbt sind, und damit Podozyten entsprechen. B: Nach anfänglich gleicher Entwicklung kommt es nach 14 Wochen zu einem signifikanten (* = $p < 0,01$) Abfall in der Zahl der Podozyten pro Glomerulus zwischen der Kontrollgruppe und den Knockouts. Die Daten beruhen auf einer Gruppengröße $n = 3$, mit jeweils 10 ausgezählten Glomeruli pro Tier. Fehlerbalken entsprechen \pm Standardfehler, die Maßstabsbalken zeigen 20 μ m.

3.5 Podozyten-spezifischer MDM2-Knockout führt zu Proteinurie

Nachdem festgestellt wurde, dass die MDM2-defizienten Tiere einen progredienten Podozytenverlust aufwiesen, untersuchten wir die Folgen dessen auf die Filterfunktion der Nieren. Hierfür wurde der Albumin-Kreatinin-Quotient bestimmt, der als Screening-Faktor für Proteinurie und damit zur Früherkennung von chronischen Nierenerkrankungen etabliert ist. Es wurden wöchentlich Urin- und Serumproben der Mäuse gewonnen und analysiert. Dabei klassifizierten wir einen Albumin-Kreatinin-Quotienten < 1 als gesund, 1 bis 5 als leichte bis mittlere Proteinurie, und einen Quotienten > 5 als schwere Proteinurie. Es zeigte sich, dass die Kontrolltiere über einen Beobachtungszeitraum von 27 Wochen bei Albumin-Kreatinin-Quotienten konstant < 1 keine Proteinurie entwickelten. Dieses Ergebnis passte zu unseren bisherigen Beobachtungen die zeigten, dass lediglich die Tiere der Knockout-Gruppe mit podozytären Veränderungen auffällig wurden. Wie in Abbildung 12 dargestellt, hatte hingegen bei den MDM2 Δ Podozyt Mäusen nach postnatal initial blandem Befund bereits ab einem Alter von 3-4 Wochen bei 55% der Tiere eine Proteinurie eingesetzt, wobei ein Tier bereits von einer schweren Proteinurie betroffen war. Nach 5-6 Wochen waren alle Tiere betroffen, 70% von einer leichten bis mittleren Form, und 30% von einer schweren Proteinurie. Der Anteil der Tiere mit einer schweren Proteinurie steigerte sich bis zum Alter von 12-13 Wochen auf nahezu 90%.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass ein Knockout des MDM2-Gens nach postnatal blandem Befund spätestens im Alter von 5-6 Wochen zu einer Proteinurie führt, die sich im Verlauf als progredient darstellt. Diese Beobachtung ist kongruent zu der oben beschriebenen Abnahme der Expression Podozyten-spezifischer Gene in den Glomeruli, ohne deren translatierte Proteine die korrekte Funktion der glomerulären Filtrationsbarriere nicht aufrecht erhalten werden kann. Da bei einer solchen Störung der Filtrationsbarriere mit strukturellen Veränderungen zu rechnen ist, untersuchten wir als nächstes die Nieren der MDM2 Δ Podozyt Mäusen im Bezug auf lichtmikroskopischen Auffälligkeiten.

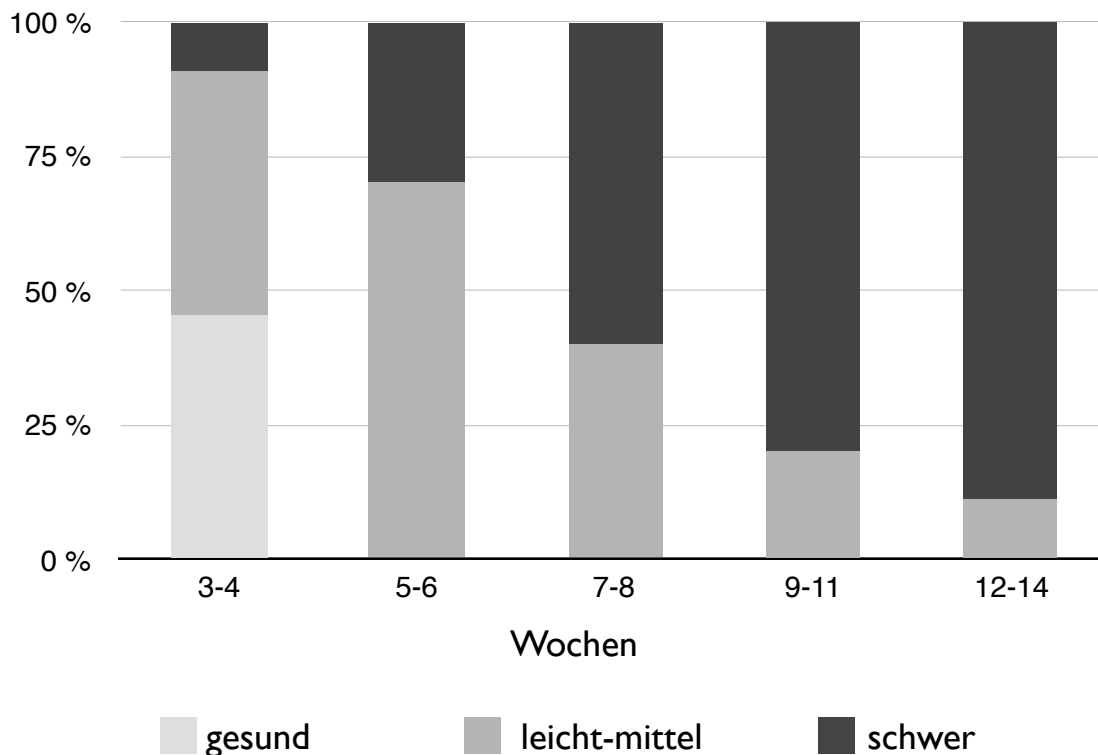


Abbildung 12: Entwicklung Proteinurie in MDM2 Δ Podozyt-Mäusen. Die Daten zeigen die Entwicklung von $n = 11$ MDM2 Δ Podozyt-Tieren über den Zeitraum von 14 Wochen. Der Anteil der proteinurischen Tiere ist progredient. In der Kontrollgruppe entwickelte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Proteinurie (nicht dargestellt).

3.6 MDM2-KO-Mäuse entwickeln eine fokal-segmentale Glomerulosklerose

Um strukturelle Auffälligkeiten in den MDM2-defizienten Nieren der Versuchstiere darzustellen, wurden histologische Schnitte angefertigt, eine PAS- bzw. Silberfärbung durchgeführt, und lichtmikroskopisch ausgewertet (Abbildung 11).

Die renale Struktur der Kontrollen erscheint dabei im Alter von 14 Wochen histologisch unauffällig; Die Glomeruli waren intakt, und es fanden sich keine Sklerosierungen von viszeralem und partialem Blatt der Bowman'schen Kapsel. Bei den MDM2-ausgeknockten Tieren waren hingegen bereits in den 8 Wochen alten Nieren Anzeichen einer Glomerulosklerose erkennbar. Die Glomeruli waren teilweise sklerosiert, es fanden sich Hyalinablagerungen, und das Mesangium und die Kapillarwände erschienen verdickt. Dabei waren nicht alle Glomeruli von den Veränderungen betroffen, und die veränderten Glomeruli waren größtenteils nur segmental sklerosiert. Bei Betrachtung der Organe von 14-wöchigen MDM2 Δ Podozyt-Tieren waren die Auffälligkeiten im Vergleich zu den 8 Wochen

alten Organen progredient. Die Sklerosierungen waren deutlich fortgeschritten und betrafen in manchen Glomeruli nun alle Segmente. Gleichzeitig fanden sich nur noch wenig nicht betroffene Gefäßkonvolute und zahlreiche Vakuolen.

Um die Auswirkungen der am ehesten einer fokal segmentalen Glomerulosklerose entsprechenden Veränderungen auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere zu quantifizieren, untersuchten wir als nächstes die physische Entwicklung der Mäuse anhand ihres Körpergewichtes.

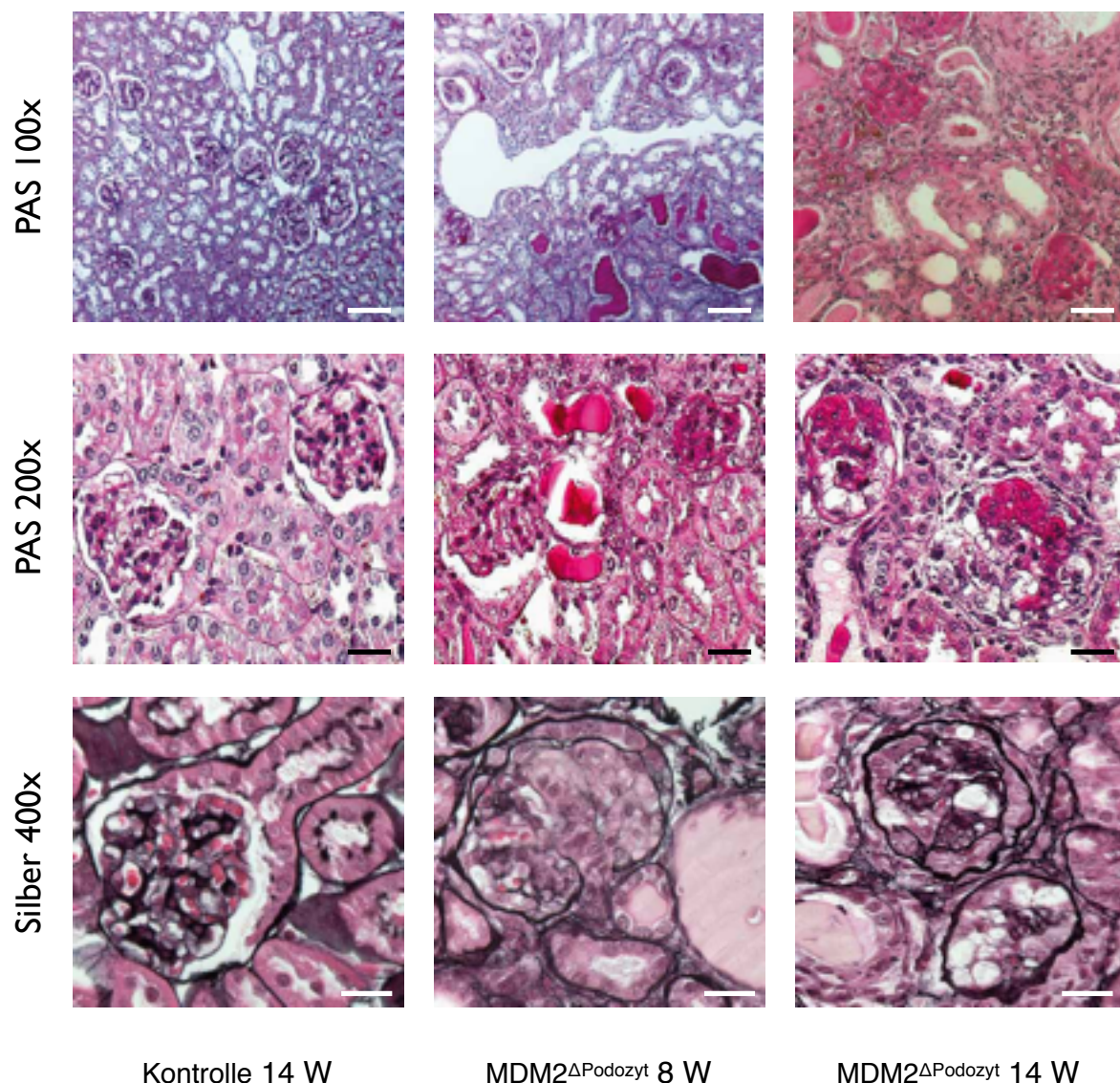


Abbildung 13: Histologie 8 und 14 Wochen alter Nieren. Während die Kontrollen unauffällig erscheinen, findet sich in den Nieren der KO-Tiere histologische Veränderungen im Sinne einer FSGS, die zwischen 8 und 14 Wochen progredient ist. In den oberen 2 Reihen erfolgte eine PAS-Färbung, in der unteren Reihe eine Silberfärbung. Die Balken entsprechen 100 μ m in der oberen, 50 μ m in der mittleren und 20 μ m in der unteren Reihe.

3.7 MDM2-Knockout führt zu keiner Änderung des Körpergewichtes

Um die Auswirkungen der beobachteten Proteinurie unter Podozytenverlust und progredienter fokal-segmentaler Glomerulosklerose auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere zu quantifizieren, wurde die physische Entwicklung der Mäuse anhand des Körpergewichts verfolgt.

Nach Durchführung der Messung über einen Zeitraum von 16 Wochen zeigten sich allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung der Versuchstiere und der Kontrolle (Abbildung 14). Beide Gruppen wuchsen gemäß der erwarteten Gewichtsentwicklung eines Wildtyps.

Da mithilfe der Gewichtsmessung die Auswirkungen des MDM2-Knockouts auf den Allgemeinzustand der Versuchstiere nicht dargestellt werden konnte, führten als nächsten Schritt eine Untersuchung der Überlebenszeit der Kontroll- und der MDM2 Δ Podozyt-Mäuse durch.

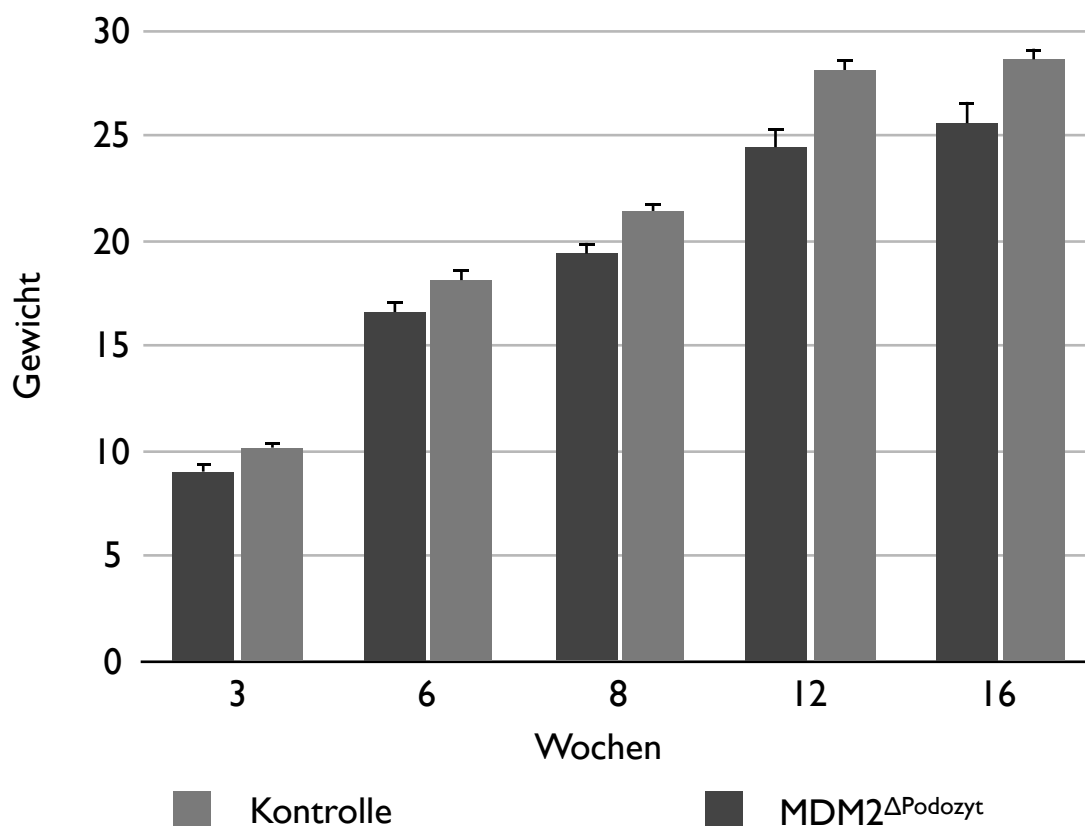


Abbildung 14: Entwicklung des Körpergewichts. MDM2 Δ Podozyt Mäuse zeigten über den Beobachtungszeitraum von 16 Wochen keinen signifikanten Gewichtsunterschied zu der Kontrollgruppe. Die hier gezeigten Daten beruhen auf einer Gruppengröße $n = 10$, die Fehlerbalken entsprechen \pm Standardfehler.

3.8 MDM2-Knockouts haben eine eingeschränkte Lebenserwartung

Wie die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten, schienen die Kontroll- und die MDM2 Δ Podozyt-Mäuse postnatal zunächst einen sehr ähnlichen Phänotyp im Bezug auf Nierenfunktion und Körpergewicht zu haben. Während die Knockout-Tiere im Zuge des Alterns mit einer eingeschränkten Nierenfunktion auffielen, blieb das Körpergewicht der beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied. Um die Auswirkungen der progredient eingeschränkten Nierenfunktion auf den Allgemeinzustand der Tiere zu quantifizieren, wurden hier die beiden Gruppen im Bezug auf ihre Überlebenszeit untersucht.

Für die Kaplan-Meier Überlebenskurve (Abbildung 15) wurden das Überleben MDM2-defizienter Tiere mit dem Überleben der Kontrollgruppe verglichen. Der Zeitraum der Untersuchung orientierte sich an dem Überleben der Knockout-Tiere; der Tod des letzten Tieres dieser Gruppe stellt das Ende des Beobachtungszeitraumes dar.

Während die Kontrolltiere allesamt den Beobachtungszeitraum überleben und damit eine normale Überlebenszeit aufwiesen, kam es in der MDM2 Δ Podozyt-Gruppe bereits nach 6 Wochen zum Verlust des ersten Tieres, der Großteil der Tiere verstarb im Alter zwischen 10 und 16 Wochen, keines der Tiere überlebte länger als 27 Wochen. Damit zeigte der Knockout im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich eingeschränkte Überlebenszeit.

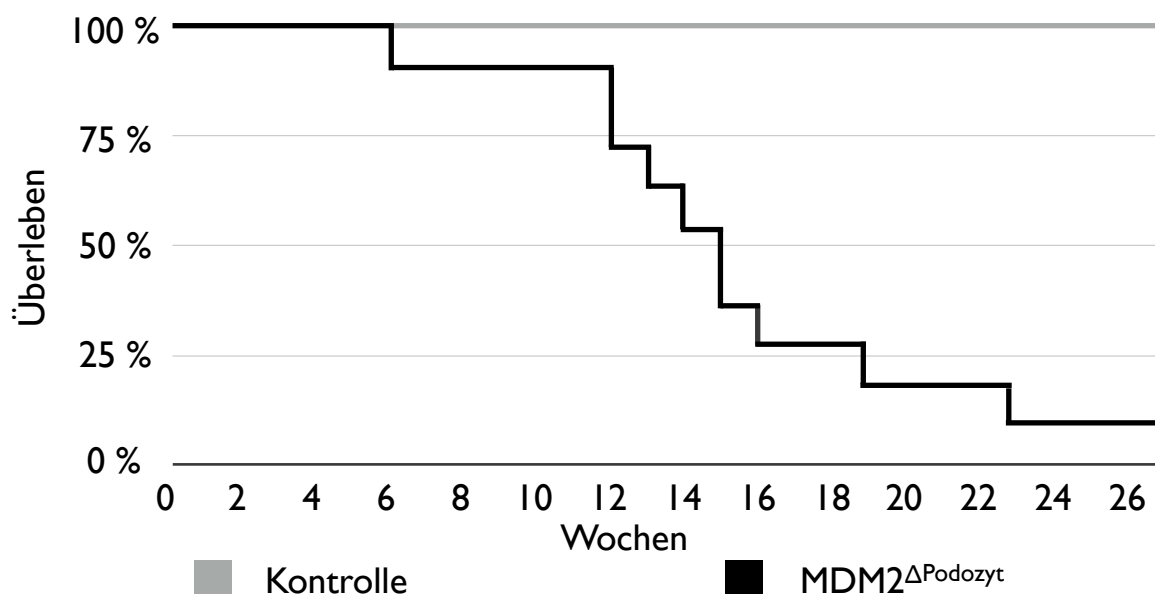


Abbildung 15: Überleben von MDM2 Δ Podozyt Mäusen und Kontrolle. Während bei der Kontrollgruppe keines in den ersten 27 Lebenswochen verstarb (normale Lebenserwartung > 1 Jahr), überlebten die Knockout-Mäuse maximal 27 Wochen. Die Daten beruhen auf n = 11 Tiere / Gruppe.

3.9 MDM2-Mangel bedingt ultrastrukturelle Auffälligkeiten der Podozyten

Nachdem wir festgestellt hatten, dass die Versuchstiere aufgrund des MDM2-Knockouts Podozytenverlust gefolgt von Proteinurie und fokal-segmentaler Glomerulosklerose aufwiesen, versuchten wir darzustellen, welche morphologische Schäden durch den MDM2-Mangel in Podozyten entstanden. Dazu untersuchten wir Nierengewebe 8- und 14-wöchiger Kontroll- und Knockout-Tiere mittels Elektronenmikroskopie (Abbildung 16).

In 8 Wochen alten Tieren der Knockout-Gruppe zeigte sich dabei eine deutliche Störung in der Architektur der Fußfortsätze; sie waren nur noch sehr unregelmäßig angelegt, abgeflacht, und größtenteils kaum noch gegeneinander abgrenzbar. Des Weiteren fanden sich zahlreiche intrazelluläre Vakuolen, die strukturelle Folgen von Streß auf das endoplasmatische Retikulum im Rahmen p53-bedingten Prozessen im Vorfeld des Podozytenuntergang darstellten. Sowohl die Integritätsstörungen der Fußfortsätze, als auch Anzahl und Größe der Vakuolen war während dem Zeitraum von 8 bis 14 Wochen deutlich progredient. Einzelne Schichten einer intakten Filtrationsbarriere war bei den 14-wöchigen Tieren nicht mehr erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigten die ebenfalls 14 Wochen alten Tiere der Kontrollgruppe intakte Fußfortsätze mit einer normalen glomerulären Filtrationsbarriere, sowie keine Vakuolenbildung.

Aus den Beobachtungen folgerten wir, dass der MDM2-Mangel in den Podozyten eine Störung der Integrität der Fußfortsätze, und damit eine Zerstörung der glomerulären Filtrationsbarriere nach sich zog, ein Vorgang, der in der gleichzeitig festgestellten Proteinurie resultierte. Außerdem kam es zu einer Schädigung des endoplasmatischen Retikulums der Zellen, was ein deutliches Zeichen für podozytären Stress darstellte. Zusammengenommen führten diese Prozesse zur Ablösung der Podozyten von der Basalmembran, und zu Podozytenuntergang.

Um festzustellen, ob die beobachteten Veränderungen angeboren waren, oder eine reguläre Anlage der Podozyten erfolgte, und es erst postnatal zu strukturellen Schäden kam, untersuchten wir die Nieren neugeborener Versuchstiere elektronenmikroskopisch.

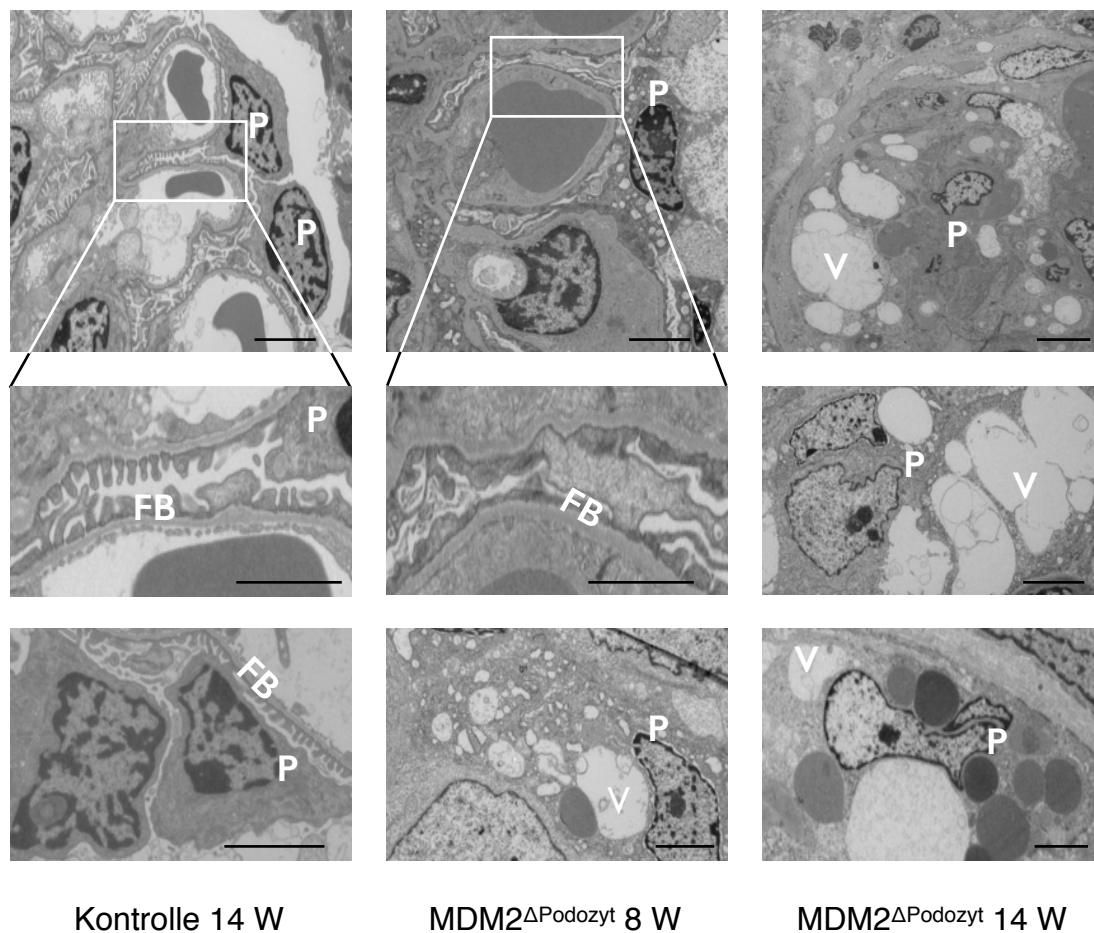


Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Podozyten. Während die Fußfortsätze und die Struktur der Podozyten der Kontrollgruppe intakt scheinen (linke Spalte), finden sich bereits in den Nieren 8 Wochen alter Knockout-Mäuse eine gestörte Architektur der Fußfortsätze (mittlere Spalte). Bei den 14-wöchigen Knockouts findet sich eine ausgeprägte Vakuolenbildung. P: Podozyt. FB: glomeruläre Filtrationsbarriere. V: Vakuole. L: Lysosom. Die Größenindikatoren zeigen 10 μ m in der linken und mittleren Spalte, und 2 μ m in rechten Spalte.

3.10 Trotz MDM2-Mangel erfolgt eine normale Entwicklung der Podozyten

Nach der Beobachtung, dass Mäuse mit podozytärem Defizit von MDM2 innerhalb weniger Wochen nach Geburt einen progredienten Podozytenverlust mitsamt Proteinurie und folgender Glomerulosklerose entwickelten, und wir auch progrediente ultrastrukturelle Schäden an alternden Podozyten feststellen konnten, untersuchten wir als nächstes Nieren am Tag 1 postnatal. Es sollte festgestellt werden, ob der MDM2-Mangel bereits die embryonale Entwicklung der Nieren beeinträchtigte, und ob bereits bei Geburt Schädigungen erkennbar waren. Dazu erfolgte die Evaluation der Nieren neugeborener MDM2 Δ Podozyt-Mäuse mittels Licht- und Elektronenmikroskopie hinsichtlich ultrastruktureller Auffälligkeiten (Abbildung 17).

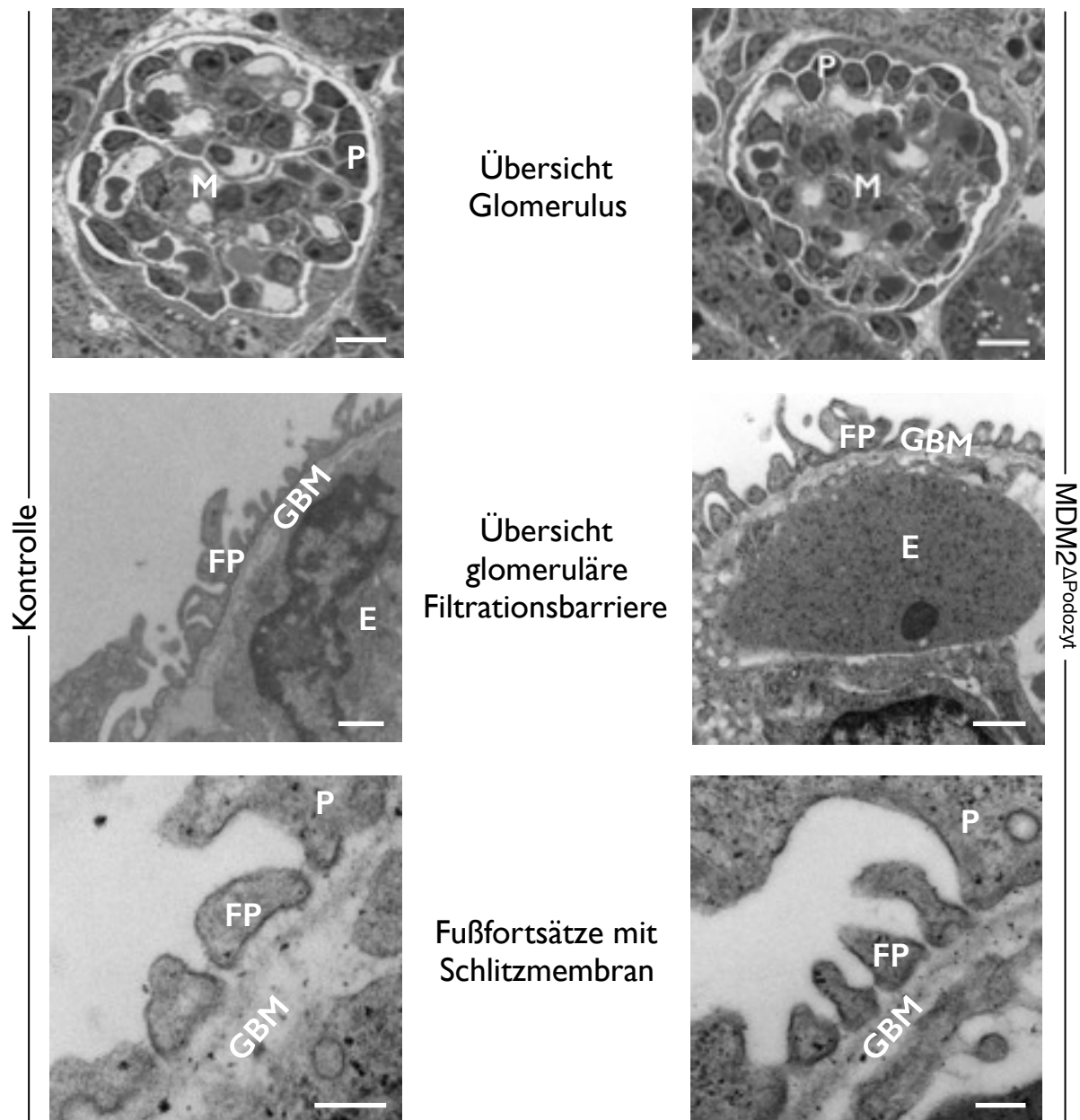


Abbildung 17: Murine Glomeruli, 1. Tag postnatal. Zwischen der Kontrolle und den $MDM2^{\Delta Podozyt}$ Tieren finden sich keine ultrastrukturellen Unterschiede bei den sich entwickelten Glomeruli, der Filtrationsbarriere oder den Fußfortsätzen. P: Podozyt. M: Mesangialzelle. E: Endothelzelle. FP: Fußfortsatz. GBM: Glomeruläre Basalmembran. Die Größenindikatoren zeigen $100\mu m$ in der oberen, $500nm$ in der mittleren, und $100nm$ in der unteren Bildreihe.

Dabei konnten wir feststellen, dass sowohl in der Knockout- als auch die Kontrollgruppe eine reguläre Anlage der Glomeruli erfolgte. Zwar war am Tag 1 postnatal die Entwicklung der Glomeruli noch nicht vollständig abgeschlossen, aber in beiden Gruppen in gleichem Maße vorangeschritten. Unterschiede hinsichtlich Größe, Aussehen oder Zellanzahl ließen sich nicht darstellen. Auch hinsichtlich der glomerulären Filtrationsbarriere erschien die Entwicklung sowohl in der Knockout-, als auch in der Kontrollgruppe gleich weit

vorangeschritten zu sein. Sowohl intakte Fußfortsätze als auch eine regelmäßige Basalmembran waren erkennbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir bei unserer Untersuchung keine Hinweise für eine gestörte embryonale Anlage oder Entwicklung der Glomeruli feststellen konnten. In der Zusammenschau mit den oben beschriebenen Ergebnissen scheint die Schädigung der Podozyten erst postnatal während der zunehmenden Beanspruchung der Podozyten im Rahmen von Filtration und Wachstum aufzutreten.

3.11 Ergebnisse der *in vitro* Experimente

Nach *in vivo* Charakterisierung des Podozyten-spezifischen MDM2-Knockouts wurden in Zellkultur Zellen einer immortalisierten Podozyten-Zelllinie und primäre Podozyten, die durch Kultur isolierter Glomeruli gewonnen wurden, auf verschiedene Weise stimuliert. Es wurde untersucht, ob sich die Effekte von MDM2-Suppression in stimulierten und nicht stimulierten Podozyten unterscheiden. Den Anstoß für dieses Experiment gab die von Mulay et al. 2012 gezeigte protektive Wirkung von MDM2-Suppression auf tubuläre Zellen im Entzündungsstadium [164]. Bei unserem Versuch erfolgte die Stimulation der Zellen mittels des TLR-Agonisten Pam3c, die MDM2-Negativregulation erfolgte durch Nutlin.

Der zur Quantifizierung von Zelluntergang durchgeführte LDH-Assay zeigte weder bei der Zelllinie noch bei den primären Podozyten aus isolierten Glomeruli signifikante Unterschiede bezüglich des Zellüberlebens zwischen den mit Nutlin, Pam3c und Pam3c & Nutlin stimulierten Gruppen (Abbildung 18). Alle drei Gruppen zeigten jedoch im Vergleich zu Zellen in Medium signifikant erhöhte Spiegel von LDH. MDM2-Suppression durch Nutlin in nicht stimulierten Zellen hat demzufolge einen vergleichbar schädigenden Effekt wie Stimulation der TLR-Rezeptoren mittels Pam3c. In der sowohl mit Pam3c stimulierten als auch mit Nutlin behandelten Gruppe konnte kein protektive Effekt einer MDM2-Suppression gezeigt werden. Die Ergebnisse sind demnach analog zu unseren *in vivo* gemachten Beobachtungen, die zeigten, dass es durch MDM2-Mangel zu Begünstigung des Podozytenuntergangs kommt.

Auch die an Tag 1 und Tag 3 angefertigten Aufnahmen der aus den isolierten Glomeruli ausgesprossenen Zellkulturen zeigen unter Stimulation im Verlauf keine signifikanten Unterschiede bezüglich Änderung der Fläche der Zellkolonien (Abbildung 19). Es kommt zu einer im Vergleich zu den Kulturen in Medium abnehmenden Fläche, die eine leichte Größenzunahme zeigt. Auch diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Effekte von MDM2-Negativregulation und Stimulation mit Pam3c einen vergleichbar schädigenden

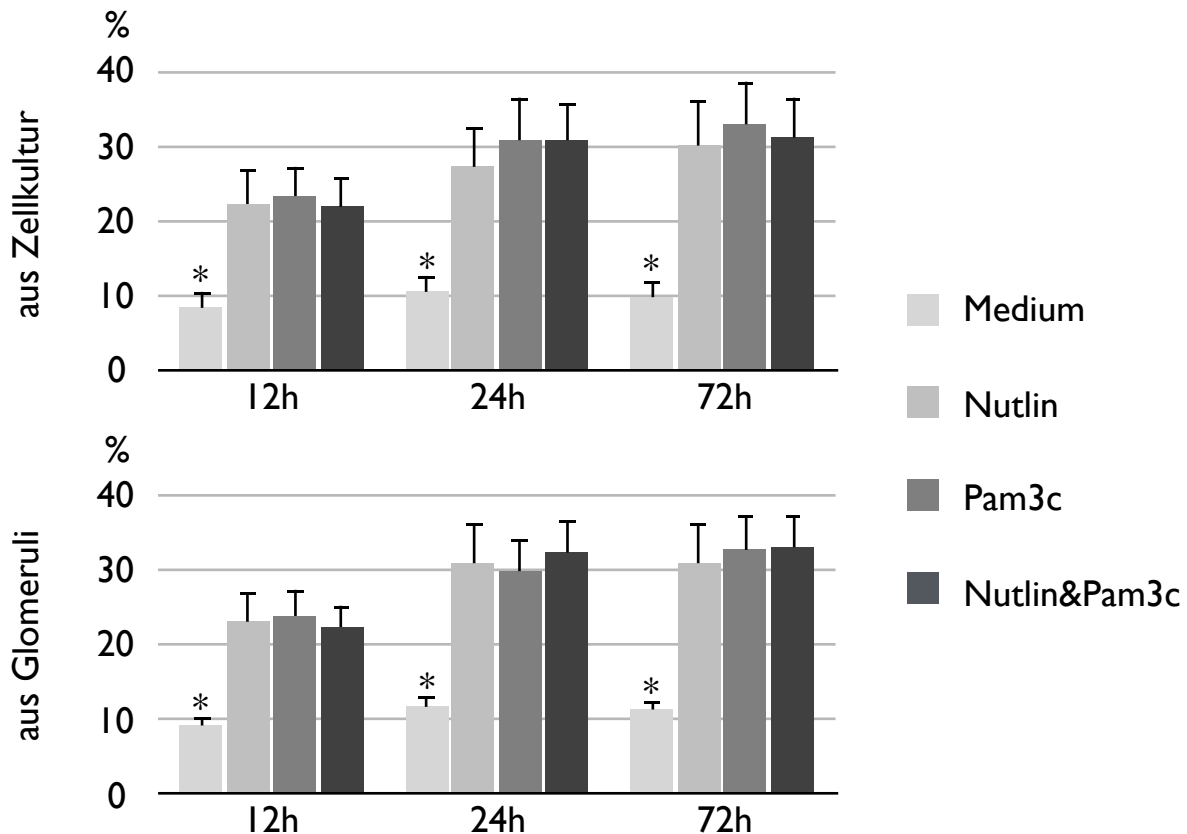
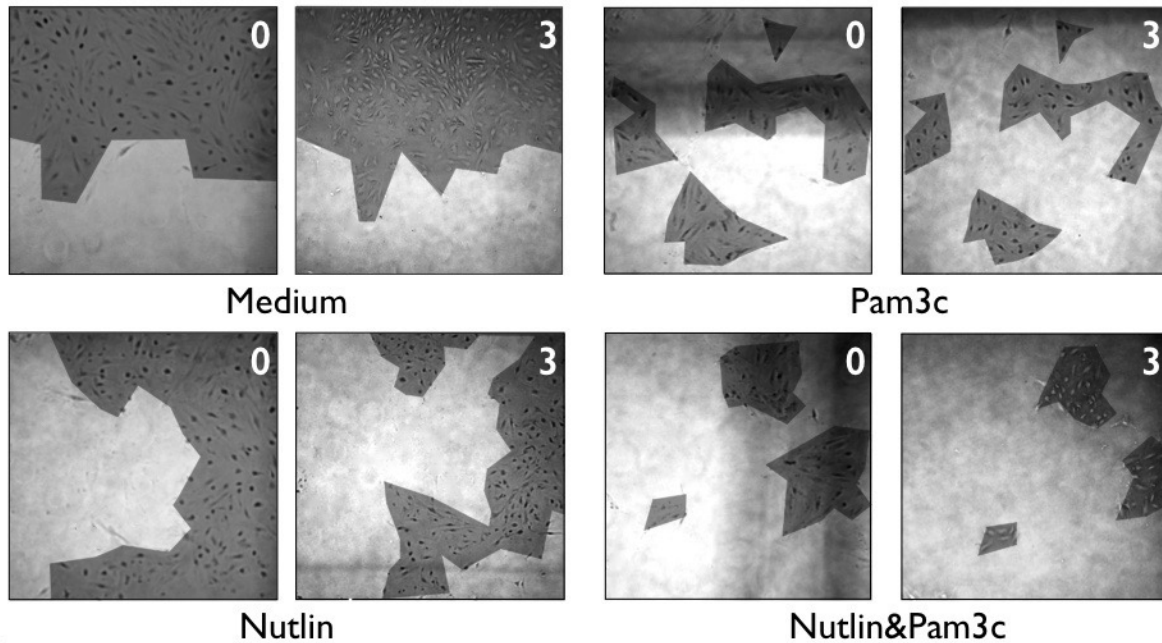


Abbildung 18: LDH-Assay nach Stimulation. Weder die Podozyten aus Zellkultur, noch die durch Isolation von Glomeruli gewonnen Podozyten zeigen signifikante Unterschiede bezüglich des Überlebens der verschiedenen stimulierten Gruppen. Lediglich im Vergleich zu Zellen in Medium weisen sie signifikant erhöhte LDH-Spiegel auf. 100%= LDH-Spiegel der TritonX Positivkontrolle (nicht dargestellt). Fehlerbalken entsprechen \pm Standardfehler.

Effekt auf das Überleben von Podozyten hat. Einschränkend muss bezüglich der Methodik der *in vitro* Versuchen allerdings bemerkt werden, dass immortalisierte Podozyten einer Zelllinie, auch wenn sie über 14 Tage ausdifferenziert sind, nicht in allen Aspekten mit Podozyten *in vivo* zu vergleichen sind, und besonders von Unterschieden hinsichtlich Überleben und Widerstandsfähigkeit ausgegangen werden muss. Des Weiteren bestehen Zweifel, ob es sich bei den aus isolierten Glomeruli ausgesprossenen Zellen um reine Podozyten-Populationen handelt. Obwohl die Glomeruli aufgrund des Isolationsprozesses größtenteils das parietale Blatt der Bowman'schen Kapsel verlieren, und damit die Podozyten die äußerste Zellschicht bilden, ist davon auszugehen, dass die Zellkolonien nicht frei von Mesangialzellen oder parietalen Epithelzellen (PECs) sind.

A



B

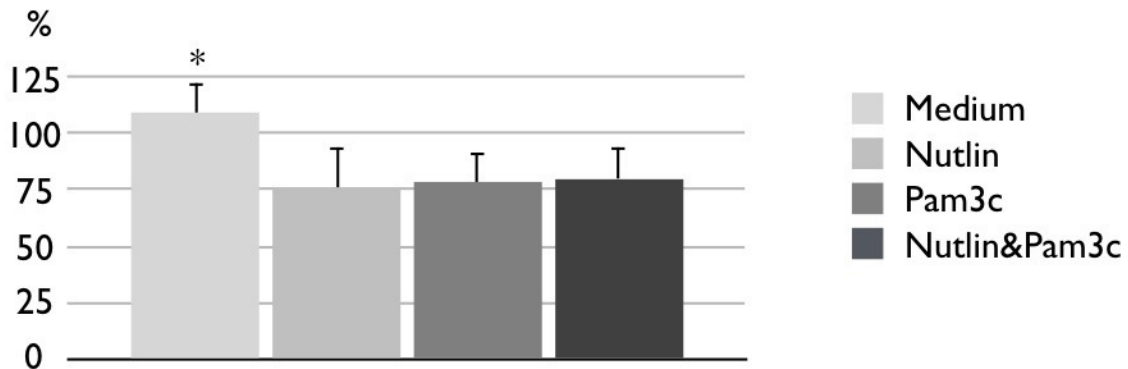


Abbildung 19: Ausbreitung der Podozytenkolonien nach Stimulation. A: Aufnahmen identischer Zellpopulationen an Tag 0 und Tag 3. Ausbreitung der Kolonien ist dunkel hinterlegt. B: Vergleich der berechneten Fläche der Zellkolonien zwischen Tag 0 und Tag 3. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den stimulierten Gruppen, die Fläche nimmt lediglich im Vergleich zu den Kolonien in Medium ab. Dargestellt sind Veränderungen im Vergleich zu Tag 0. Tag 0=100%. Es erfolgte eine Auswertung von n=20 Kolonien pro Gruppe.

3.12 Zusammenfassung der Ergebnisse

In unserem Mausmodell erfolgte mittels des Cre/loxP-Systems ein erfolgreicher Knockout des MDM2-Gens in Podozyten, der mittels Immunhistologie, Westernblot und qPCR verifiziert wurde. In Podozyten konnten daraufhin reaktiv erhöhte p53-Spiegel festgestellt werden.

Die Podozyten-Entwicklung erfolgte pränatal bezüglich Quantität und Morphologie normal, bei Geburt waren zwischen Knockout und Kontrolle keine Unterschiede diesbezüglich feststellbar. Postnatal zeigte sich ein im Verlauf progredienter Podozytenverlust, eine progrediente Proteinurie, sowie eine Verminderung der Expression Podozyten-spezifischer Gene (Podocin, Synaptopodin). Es waren keine Unterschiede bezüglich des Gewichtes der Versuchstiere feststellbar. Mittels Elektronenmikroskopie ließen sich Störungen der Struktur der Fußfortsätze, die mit Ablösung von der glomerulären Basalmembran einhergingen, sowie eine verstärkte Vakuolenbildung innerhalb der Zellen nachweisen. Podozytenverlust und Proteinurie gingen mit einer ebenfalls progredienten fokal-segmentalen Glomerulosklerose einher. Die Knockout-Tiere eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduzierte Lebenserwartung.

Bei der Stimulation bzw. MDM2-Suppression von Podozyten (Zelllinie und primär aus isolierten Glomeruli) zeigte sich im LDH-Assay und mithilfe der Messung der von Zellen besiedelten Fläche keine Unterschiede zwischen den mit Nutlin, Pam3c und Nutlin & Pam3c stimulierten Gruppen. Das Überleben dieser Zellen war stets geringer als das Überleben der in Medium kultivierter Zellen. Der Effekt supprimierter MDM2-Spiegel ist demzufolge ähnlich schädlich für das Überleben von Podozyten wie Stimulation mit Pam3c.

MDM2 und die damit verbundene Negativregulation der p53-Spiegel ist somit für das Überleben von Podozyten und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber physiologischem Stress essenziell. MDM2 befähigt Podozyten, die glomeruläre Filtrationsbarriere über Jahrzehnte aufrecht zu erhalten, und die Nierenfunktion zu gewährleisten.

4 Diskussion

MDM2 ist der wichtigste Negativregulator des Tumorsuppressors p53, und führt bei einem systemischen Knockout zu embryonaler Letalität [114, 115, 175]. Bei gewebespezifischen Knockouts ist der Phänotyp im wesentlichen Abhängig von der Regenerationsfähigkeit und der Funktion des betroffenen Gewebes, und reicht von Letalität [176] über Organfehlbildungen [177] bis hin zu Regeneration des betroffenen Gewebes [178]. MDM2-Mangel resultiert also in einem Untergang der betroffenen Zellen, und den für den Organismus damit verbundenen Folgen.

Diese bekannten Auswirkungen des MDM2-Mangels konnten wir durch Charakterisierung des Podozyten-spezifischen MDM2-Knockouts bestätigen. Im Gegensatz dazu zeigten Mulay et al. 2012 aber auch, dass eine MDM2-Suppression einen begrenzenden Einfluss auf die reaktive Entzündung infolge einer akuten Nierenschädigung in einem Model der Adriamycin induzierten Nephropathie haben kann [146]. Dies kommt einem protektivem Einfluss auf die Zellen gleich, und scheint damit im Gegensatz zu den übrigen Beobachtungen zu stehen.

Die Motivation für unsere Arbeit bestand darin, dass zu den Folgen eines MDM2-Mangels für die Entwicklung und das Überleben von nicht stimulierten Podozyten in vivo bisher keine Daten vorlagen. Auch die Frage, ob niedrige MDM2-Spiegel eventuell einen protektiven Effekt haben, wie er im Adriamycin-Modell demonstriert wurde, konnte nicht beantwortet werden.

Die durch diese Arbeit generierten Ergebnisse unterstützen unsere ursprüngliche Hypothese, dass MDM2 für das Überleben von Podozyten und ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber Stress essenziell ist. Ohne MDM2 scheinen die Podozyten nicht in der Lage zu sein, die glomeruläre Filtrationsbarriere über den beträchtlichen Zeitraum eines Menschenlebens aufrecht zu erhalten. Ein protektiver Effekt des MDM2-Mangels auf das Überleben von nicht-stimulierten Podozyten konnte somit ausgeschlossen werden.

Neben der Charakterisierung des Phänotyps des podozytären MDM2-Knockouts leiteten wir folgende Erkenntnisse bezüglich der Funktion von MDM2 in unstimulierten Podozyten aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen ab:

1. Selbst unter dem zelltypspezifischen podozytären MDM2-Knockout kommt es zu regelrechter embryonalen Entwicklung und Anlage sowohl der Nieren als auch der Podozyten. Dies zeigt, dass niedrige MDM2-Spiegel während der sehr frühen Entwicklungsphase der Podozyten noch nicht zum Untergang dieser führen, und der Knockout zu keiner Entwicklungsstörung des übrigen Organismus führt.
2. Der Podozyten-Untergang erfolgt beim MDM2-Knockout bereits unter physiologischen Bedingungen. Es bedarf keinem besonderen Stimulus, um den Untergang der Zellen einzuleiten. MDM2 ist daher in Podozyten nicht erst während renalen Erkrankungen oder dem Einfluss pathologischer Stimuli essenziell, sondern bereits für die Aufrechterhaltung der Homöostase unter physiologischen Bedingungen.
3. Die systemische Gabe von MDM2-Antagonisten, beispielsweise im Rahmen von Tumorthérapien, könnte gravierende Auswirkungen auf das Überleben von Podozyten haben, und damit dosislimitierende Nebenwirkungen auslösen.

4.1 Trotz MDM2-Knockout erfolgt eine regelrechte Anlage der Podozyten

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die MDM2^{ΔPodozyt}-Tiere initial die gleiche Podozytenzahl wie Tiere der Kontrollgruppe aufwiesen, und es erst postnatal im Laufe von Wochen zu einem signifikanten Podozytenverlust kam. Auch haben EM-Aufnahmen belegt, dass sich postnatal keine Unterschiede bezüglich der Ultrastruktur der Zellkörper, der Fußfortsätze oder dem Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere feststellen lassen. Dies bedeutet, dass MDM2 für das Überleben von Podozyten essenziell ist, allerdings nicht für deren Anlage und Entwicklung während der Embryogenese. Damit scheinen Podozyten in der Frühphase ihrer Entwicklung weniger empfindlich für niedrige MDM2-Spiegel zu sein als andere Zelltypen.

Bei einem gewebeübergreifendem MDM2-Knockout sind die Embryos nicht überlebensfähig, da es aufgrund eines massiven Anstiegs der p53-Spiegel zu einer Aktivierung p53-abhängiger proapoptotischer Mechanismen kommt, und damit Zell- und Gewebeuntergang bereits im Blastozysten-Stadium auftritt [114, 115, 175]. Die p53-Abhängigkeit ließ sich mit einem gleichzeitigen Knockout von p53 belegen, was zu einem Überleben der MDM2-defizienten Versuchstiere führte [114, 115, 175]. Andere Studien beschreiben den negativen Effekt niedriger MDM2-Spiegel auf die Entwicklung von Neuronen im zentralen Nervensystem und die Hämatopoese [179]. Während der embryonalen Entwicklung ist die Negativregulation von p53 durch MDM2 demzufolge essenziell. Dadurch können auch zelltypspezifische Knockouts zu embryonaler Letalität führen. In Kardiomyozyten beispielsweise führt die Abwesenheit von MDM2 bereits in der Embryonalphase zu Zelluntergang in einem solchen Ausmaß, dass Herzversagen die Folge ist [127]. Ein weiteres Beispiel für einen Knockout mit embryonaler Letalität ist der Knockout von MDM2 in Zellen des sich entwickelnden Nervensystem, der ebenfalls die Entwicklung gravierend schädigt, sodass der Tod des Embryos die Folge ist [180]. Und auch für die korrekte Anlage und Entwicklung der Niere ist MDM2 grundsätzlich obligat, wie ein Knockout in renalen Vorläuferzellen während der metanephrischen Entwicklungsphase zeigt. Hierbei ist die Folge eine Fehlanlage der Nieren, die ebenfalls zum Absterben des Embryos führt [167]. Dass auch der Zelluntergang nach zelltypspezifischem MDM2-Knockout durch p53-abhängige Apoptose bedingt ist, zeigen Studien zu Hoden, Thymus, Milz, Erythrozyten, glatter Muskulatur, Knochen und Leber [181-184].

Der wesentliche Unterschied zwischen dem Knockout in Kardiomyozyten oder in Nervenzellen und dem MDM2-Knockout in Podozyten besteht unseren Beobachtungen nach darin, dass die Entwicklung der beiden erstgenannten Zelltypen durch die niedrigen

MDM2-Spiegel so nachhaltig gestört wird, dass sie ihren Beitrag zum Überleben des Embryos nicht mehr leisten können, und dieser daraufhin stirbt. Bei den Podozyten hingegen hat die MDM2-bedingte Störung keinen gravierenden Einfluss auf die pränatale Entwicklung der Versuchstiere, sodass es erst postnatal zu Defiziten kommt.

Die durch unseren Knockout nicht maßgeblich gestörte embryonale Entwicklung der Versuchstiere dieser Studie führen wir dabei auf die hohe Spezifität der von uns durchgeführten genetischen Veränderungen, sowie auf die pränatal nicht essenzielle Rolle von Podozyten, zurück. Die Expression der Cre-Recombinase erfolgte unter Kontrolle des Podocin-Promotors. Boote et al. 2000 demonstrierten die Spezifität von Podocin für Podozyten [185], sodass das Cre/loxP System ausschließlich in Zellen mit aktivem Podocin-Promotor aktiviert wurde. Die übrigen renalen Vorläuferzellen waren nicht von der genetischen Modifikation betroffen, und konnten in physiologischer Weise zur Entstehung der Niere beitragen. Des Weiteren müssen Podozyten, anders als Kardiomyozyten oder Nervenzellen, ihrer physiologischen Aufgaben pränatal noch nicht in vollem Umfang nachkommen. Die für die korrekte Funktion der Niere notwendige glomeruläre Filtrationsbarriere, die im wesentlichen von den Podozyten aufrecht erhalten wird, wird pränatal durch die Filterfunktion der Plazenta entlastet, sodass eine Fehlfunktion der Podozyten keine vitalitätsbedrohenden Auswirkungen auf den sich entwickelnden Organismus hat. Erst postnatal kommt es zur Exkretion harnpflichtiger Substanzen über die Niere, sodass die Funktion von Podozyten essenziell wird [186]. Ab diesem Zeitpunkt sind Podozyten verstärkt Beanspruchung und Schädigung ausgesetzt, was in den Knockout-Mäusen zu progredientem Zelluntergang führte.

Es ist denkbar, dass pränatal die p53-Spiegel von anderen regulierenden Molekülen, wie beispielsweise dem MDM2-ähnlichen MDM4 [187], so weit unter Kontrolle gehalten werden, dass es nicht zu spontaner Apoptose kommt. Da MDM2 und MDM4 ihre Funktion zumindest teilweise unabhängig voneinander erfüllen [137], ist MDM4 von dem MDM2-Knockout nicht direkt betroffen, sodass es die p53-Spiegel senken kann. Nach postnatalem Anstieg der Belastung bzw. der Schädigung von Podozyten durch verschiedenste Noxen könnte die Wirkung von MDM4, die aufgrund der schwächeren Affinität von MDM4 zu p53 geringer ist als die Wirkung von MDM2, dann nicht mehr ausreichend gewesen sein, um p53-abhängigen Podozytenverlust zu vermeiden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Mäusen mit Podozyten-spezifischem MDM2-Knockout eine normale embryonale Entwicklung abläuft, sodass diese lebensfähig sind. Erst postnatal kommt es zu Schädigung sowie Verlust von Podozyten, was mit Entstehung einer zunächst fokal-segmentalen Glomerulosklerose und mit progredienter Abnahme der Nierenfunktion einhergeht.

4.2 MDM2-Knockout führt zum Untergang nicht-stimulierter Podozyten

Die Motivation für unsere Untersuchung der Rolle von MDM2 in Podozyten entstand unter anderem aus Vorarbeiten, veröffentlicht von Mulay et al. 2013, die zeigten, dass innerhalb einer Podozytenpopulation, die mit Adriamycin stimuliert wurden, MDM2-Blockade sowohl Podozytenverlust als auch die Entwicklung von Proteinurie positiv beeinflusste [146]. Die Ursache für diesen beobachteten scheinbar paradoxen Effekt von MDM2, welcher hauptsächlich proliferationsfördernd und antiapoptotisch ist, wird darin vermutet, dass als Reaktion auf den Untergang von einzelnen Podozyten ein Wachstumsstimulus auf die verbleibenden Podozyten wirkt. In diesen Situationen kann der proliferationsfördernde Effekt von MDM2, anders als in der Embryonalphase [127, 167, 180], einen negativen Effekt auf das Überleben der Zellen haben. Der Grund dafür liegt in der ausgeprägten Differenzierung der Podozyten, die mit der Bildung eines komplexen Zytoskeletts einhergeht. Dies führt dazu, dass sie ihre Fähigkeit zur Mitose weitestgehend verlieren [188]. Vollziehen die Podozyten den Übergang vom Ruhestadium in das Synthesestadium, bedingt dies als Vorbereitung auf die folgende Mitose eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, was ihre Ablösung von der glomerulären Basalmembran und damit den Verlust der Zellen zur Folge hat. Dieser Vorgang wird als katastrophale Mitose bezeichnet [188-190]. Mulay et al. zeigten, dass dieser Effekt in dem Adriamycin-induzierten Modell einer akuten Nierenerkrankung durch die Blockade von MDM2 mittels dem Antagonisten Nutlin-3a abgemildert werden kann [146], und folgerten daraus, dass MDM2-Antagonisten auch den Verlauf von chronischen Nierenerkrankungen positiv beeinflussen könnten.

Die daraus abzuleitende Annahme, dass MDM2 auch unter physiologischen Bedingungen, also in nicht stimulierten Zellen, einen negativen Einfluss auf das Überleben von Podozyten haben könnte, wurde im Rahmen dieser Arbeit widerlegt.

In vivo kam es bei ansonsten gesunden MDM2^{ΔPodozyt}-Tieren bereits wenige Wochen postnatal sowohl zu einem Anstieg der Proteinurie, als auch zu einer Abnahme der Podozytenzahl. Der bei den Versuchstieren festgestellte rasch progrediente Podozyten-

verlust zeigte, dass bereits normale Belastungen, wie sie in einem gesunden Organismus auftreten, der noch nicht einmal durch Prozesse wie Schwangerschaft, Altern, oder Hypertonie belastet ist, ausreichen, um die Homöostase MDM2-defizitärer Podozyten schon nach kurzer Zeit irreversibel aus dem Gleichgewicht zu bringen, und so ihren Untergang einzuleiten. Es scheint daher unwahrscheinlich, dass die Gabe von MDM2-supprimierenden Substanzen, wie beispielsweise Nutlinen, einen positiven Effekt auf den Verlauf von chronischen Nierenerkrankungen haben könnte. Und auch in den in-vitro Experimenten zeigte sich kein positiver Einfluss von MDM2-Antagonisten auf das Überleben von Podozyten, weder in den mit Pam3c stimulierten, noch in den unstimulierten Zellen. Die Schädigung unter MDM2-Suppression war vergleichbar mit dem Ausmaß der Schädigung unter Pam3c-Stimulation. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass niedrige MDM2-Spiegel einen ähnlich schädigenden Effekt auf Podozyten haben wie TLR-Rezeptor-Stimulation, die beispielsweise in Entzündungsprozessen auftritt. Damit fügen sich die Ergebnisse unserer Studie in das Bild der Funktion von MDM2, das durch Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen entstanden ist, die Folgen von MDM2-Mangel in verschiedenen Geweben untersucht haben. Einen Überblick verschafft Tabelle 3.

In einem Mausmodell, in dem MDM2 postnatal selektiv in den Zellen der glatten Muskulatur ausgeschaltet wurde, kam es unmittelbar nach dem Eingriff zum Zelluntergang. Die dadurch bedingten Funktionsstörungen, vor allem in den Wandschichten des Magen-Darm-Trakts, führten Rasch zum Tod der Versuchstiere [176]. In den MDM2-supprimierten Zellen ließen sich dabei reaktiv erhöhte Spiegel des maßgeblich an der Induktion von Apoptose beteiligten Moleküls p53 feststellen [176]. Ein weiteres Beispiel für einen durch MDM2-Knockout ausgelösten Gewebeuntergang lieferten Jaramillo-Rangel et al. 2013, dessen Arbeitsgruppe die durch MDM2-Knockout bedingten Folgen an den Augen demonstrierte [177]. Hier kam es durch den MDM2-Mangel zu ausgeprägter Mikrophthalmie. Und auch eine MDM2-Deletion in der subventrikulären Zone des Gehirns, in der neuronale Stammzellen lokalisiert sein sollen, und in welcher es zur Proliferation von Neuronen kommen soll [191], zieht p53-abhängigen Zelluntergang nach sich [144, 192]. Die erwähnten Beispiele zeigen deutlich, dass es, sobald ein Mangel von MDM2 herrscht, in den betroffenen Geweben rasch zum ausgeprägten Zelltod kommt. Allerdings gibt es auch Gewebe, in denen der p53-vermittelter Zelluntergang durch Proliferation benachbarter Zellen kompensiert wird, ein Mechanismus wie er beispielsweise bei Zellen der Darmschleimhaut auftritt [178]. Anders als in den oben beschriebenen Geweben gelingt es verbleibenden Zellen, die eine Resistenz gegen die MDM2-Suppression aufweisen, mittels Proliferation die funktionelle

Tabelle 3: Phänotypen MDM2-genveränderter Mäuse (nach Wade et al. 2013)

Gewebe	Genotyp	p53-Regulation	Phänotyp	Quelle
ZNS	MDM2 ^{-/-}	Nestin-Cre; Trp53 ^{LSL/-}	embryonale Letalität; Apoptose	188
	MDM2 ^{FM/FM}	Nestin-Cre	embryonale Letalität; Apoptose	175
	MDM2 ^{-/-}	Trp53 ^{ER/-}	kein Effekt	197
Darm	MDM2 ^{FM/FM}	Villin-Cre	Apoptose	173
	MDM2 ^{-/-}	Trp53 ^{ER/-}	Apoptose	197
glatte Muskulatur	MDM2 ^{FM/FM}	Sm22-CreERT ²	Zelluntergang	170
Erythrozyten	MDM2 ^{lox/lox}	EporGFP-Cre/+	embryonale Letalität; Apoptose	189
Herz	MDM2 ^{FM/-}	Myhc-Cre	embryonale Letalität; Apoptose	126
	MDM2 ^{-/-}	Trp53 ^{ER/-}	kein Effekt	197
Thymus und Milz	MDM2 ^{-/-}	Trp53 ^{ER/-}	Apoptose	197
Hoden	MDM2 ^{-/-}	Trp53 ^{ER/-}	Proliferationsstop	197
Lunge, Niere, Leber	MDM2 ^{-/-}	Trp53 ^{ER/-}	kein Effekt	197
Linse	MDM2 ^{-/-}	Tgp53 ^{t/0}	Apoptose	171

Integrität des Zeltverbandes wieder herzustellen. In ausdifferenzierten Zellverbänden, wie beispielsweise der Podozytenpopulation, besteht diese Möglichkeit der Regeneration allerdings nicht, da, wie oben bereits erläutert, die Fähigkeit zur raschen Proliferation im Laufe der Differenzierung verloren gegangen ist [56].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unsere Ergebnisse mit Studien aus anderen Zelltypen übereinstimmen die besagen, dass niedrige MDM2-Spiegel bereits unter physiologischen Bedingungen zu einem p53-bedingten Zelluntergang führen [127, 176-178, 180]. Anders als in Modellen mit stimulierten Podozyten [146] konnte hier keine positiven Auswirkungen eines MDM2-Mangels auf die Nieren festgestellt werden. Die aufgrund zahlreicher andere Studien sowie der bekannten Wirkung von MDM2 [111, 112, 193] naheliegende p53-Abhängigkeit dieses Zellverlustes in unserer Untersuchung wird allerdings nur durch die p53-Färbung belegt. Um die p53-Abhängigkeit zu verifizieren, empfiehlt es sich einen Co-Knockout von MDM2 und p53 in Podozyten durchzuführen, bei dem es unseren Erwartungen nach zu einer Rettung des Phänotyp kommen sollte.

4.3 MDM2-Antagonisten bergen Risiko der Podozytenschädigung

Nachdem erkannt wurde, dass ein Mangel von p53 an der Genese verschiedenster Tumore maßgeblich beteiligt ist [99, 194], und auch Amplifikationen oder Überexpression des MDM2-Gens Tumore verursachen können [131], rückte sowohl MDM2 als auch die Mechanismen der p53-MDM2-Interaktion als potentielle Ansatzpunkte für neue Krebstherapeutika in das Zentrum wissenschaftlichen Interesses.

Ein Mangel an funktionalem Wildtyp-p53, wie sie entweder durch mutationsbedingte Fehler bei der Bildung des Moleküls, oder aber auch bei übermäßiger Suppression durch beispielsweise MDM2 auftreten können, führen zu einer fehlenden Kontrolle der Zellproliferation durch p53, und begünstigen Überleben und Wachstum entarteter Zellen [99]. Die Erhöhung der p53-Spiegel bzw. die Stärkung der p53-Funktion in Tumoren, die sowohl durch Senkung der MDM2-Spiegel als auch durch Störung der p53-MDM2-Interaktion erreicht werden kann, ist somit ein potentielles Ziel für Krebstherapeutika. Dabei liegt die Stärke der MDM2-Antagonisten, wie beispielsweise Nutlins, darin, dass sie die Erhöhung der p53-Spiegel durch Modifikation eines physiologischen Regelkreises erreichen, was auf deutlich geringeres Auftreten von Nebenwirkungen als bei traditionellen zytotoxischen Verfahren wie Bestrahlung oder Chemotherapie hoffen lässt [148, 195]. Die Entwicklung potentieller Wirkstoffe ist inzwischen so weit fortgeschritten, dass verschiedene Substanzen bereits im Rahmen von klinischen Studien untersucht werden (siehe Tabelle 2, Seite 28). Erste Ergebnisse lassen dabei auf erfolgreiche Hemmung des Wachstums verschiedener Tumorarten schließen, sodass mit einer Ausweitung der Studien zu rechnen ist.

Da die Gabe von MDM2-Antagonisten allerdings systemisch erfolgt, sind nicht nur Tumorzellen der antiproliferativen Wirkung ausgesetzt, sondern auch alle übrigen Gewebe des Organismus. Während der Effekt bei rasch proliferierenden Geweben eher kompensiert werden kann, sind die Folgen für differenzierte und damit nicht oder nur langsam proliferierende Gewebe sowie für Situationen, in denen Zellproliferation notwendig ist, als deutlich gravierender einzuschätzen. Neben negativen Effekten auf Wundheilung [164] wurden auch negative Effekte von MDM2-Inhibitoren auf Angiogenese nachgewiesen [196, 197]. In einer klinischen Studie fiel besonders eine hämatologische Toxizität der untersuchten Substanz auf: bei der Behandlung von Liposarkomen kam es beispielsweise bei 30% der Probanden zu einer Neutropenie Grad IV, und bei 15% zu einer Thrombozytopenie Grad IV [198, 199]. Außerdem kam es bei allen Patienten dieser Studie zu mindestens einer unerwünschten Nebenwirkung, darunter Übelkeit, Erbrechen,

Asthenie und Durchfall. Die Verträglichkeit von MDM2-Suppressoren ist demzufolge eingeschränkt. Des Weiteren gibt es Berichte, dass es in Folge von Behandlungen mit MDM2-Inhibitoren zu einem verstärkten Auftreten von p53-Mutationen gekommen ist [200], die das Risiko der Entstehung von Zweittumoren erhöhen. Diese Beobachtungen zeigen, dass die systemischen Nebenwirkungen der MDM2-Inhibitoren im Rahmen von Krebstherapien dosislimitierend sein können.

Andere Studien besagen, dass die proapoptotische Wirkung von MDM2-Antagonisten selektiv für Tumorzellen ist, und andere Zellarten von dem Effekt nicht betroffen sind [148, 159]. Da diese Ergebnisse allerdings aus der Anfangszeit der Erforschung von MDM2-Suppressoren stammen, dürfen sie heute als überholt eingeschätzt werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass erhöhte p53-Spiegel nicht auf alle Gewebearten einen schädigenden Einfluss haben, was einen Hinweis auf die unterschiedliche Sensitivität von verschiedenen Gewebearten auf MDM2-Suppression gibt [201], wobei man allerdings trotzdem nicht von einer Tumorselektivität sprechen kann. Die Ergebnisse unserer Studie implizieren, dass Podozyten zu den Zellen gehören, die empfindlich auf niedrige MDM2-Spiegel reagieren, und die daraus resultierenden Folgen einen potentiell limitierenden Faktor für den klinischen Einsatz von MDM2-Antagonisten darstellen könnten.

Es ist daher anzustreben, möglichst geringe Dosen der jeweiligen MDM2-Antagonisten einzusetzen, um eine Senkung der p53-Spiegel in gesunden Zellen auf ein Minimum zu reduzieren. In dieser Eigenschaft unterscheiden sich die neuen Wirkstoffe in der Krebstherapie nicht von etablierten Chemotherapeutika. Um bei niedriger Dosierung einen ausreichenden therapeutischen Effekt zu erzielen, werden diese Substanzen bei verschiedenen Tumoren im Rahmen von Kombinationstherapien erfolgreich eingesetzt [202], wobei auf einen unterschiedlichen molekularen Wirkmechanismus der kombinierten Substanzen zu achten ist. MDM2-Antagonisten bieten aufgrund ihres neuen Wirkmechanismus somit die Möglichkeiten zur Kombination mit etablierten Substanzen. Dadurch lassen sich therapeutische Effekte in niedrigen Dosierungen erzielen, womit die Nebenwirkungen auf ein Minimum reduziert werden können. Die erfolgreiche Kombination mit etablierten Chemotherapeutika konnte dabei bereits in verschiedenen Studien verifiziert werden, und wird derzeit in klinischen Studien weiter untersucht. Einen Überblick verschafft Tabelle 4. In den bereits abgeschlossenen Studien konnte dabei wie zu erwarten durch die Kombination eine bessere Wirksamkeit erzielt werden [203, 204].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Podozyten aufgrund der Tatsache, dass sie ohne suffiziente MDM2-Spiegel rasch zugrunde gehen, möglicherweise sensibel für MDM2-Antagonisten sind, die derzeit als potentielle Krebstherapeutika erprobt werden.

Tabelle 4: Kombinationstherapien mit MDM2-Antagonisten (nach Burgess et al. 2016)

MDM2-Antagonist	Kombinationspartner	Tumorart
RG7112	Cytarabin	akute Myeloische Leukämie
RG7112	Doxorubicin	fortgeschrittene Weichteilsarkome
RO5503781	Cytarabin	akute Myeloische Leukämie
RO5503781	Abirateron	fortgeschrittene Prostata-CA
SAR405838	Pimasertib	solide Malignome
HDM201	Ribociclib	Liposarkome
MK4828	Cytarabin	akute Myeloische Leukämie
AMG232	Trametinib und Dabrafenib	metastasierendes Melanom

Beim klinischen Einsatz dieser Substanzen ist demzufolge unter anderem die Schädigung von Podozyten potentiell limitierend, sodass beispielsweise durch Kombinationstherapie die Verwendung möglichst geringer Dosen angestrebt werden sollte. Des Weiteren ist zum Zwecke der Früherkennung etwaiger Schäden aufgrund des möglichen Podozytenverlustes eine konsequente Überwachung der Nierenfunktion anzuraten.

4.4 Methodische Limitationen

Abschließend möchten wir darauf hinweisen, dass für die Interpretation der Ergebnisse unserer Studie klare Beschränkungen gelten, und somit eher als Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen angesehen werden sollten, als die Basis für abschließende Erkenntnisse darzustellen. Aufgrund Verwendung eines Maus-Modells lassen die Ergebnisse grundsätzlich nur eingeschränkte Rückschlüsse auf die physiologische Rolle von MDM2 in humanen Podozyten zu. Um die Effekte von MDM2-Suppression auf Podozyten im Menschen zu evaluieren, empfiehlt sich breit angelegte Zellkultur-Studien mit primären humanen Podozyten, bzw ein Monitoring der Nierenfunktion bzw. die Untersuchung von Nierenbiopsien im Rahmen klinischer Studien, wie sie bereits zu dem Thema MDM2-Suppression bei Tumoren laufen. Des Weiteren birgt das von uns genutzte, nicht-induzierbare Cre/loxP-System Unwägbarkeiten, wie beispielsweise eine nicht immer zu 100% erfolgende Entfernung des mit loxP-markierten Genabschnitts. Die Protein- und cDNA-Isolation erfolgte darüber hinaus aus isolierten Glomeruli, da eine suffiziente Isolation einzelner Podozyten technisch nicht durchführbar war. Dadurch wurde auch Protein und cDNA aus anderen glomerulären Zellen, wie beispielsweise Mesangial- oder Kapillarepithelzellen, isoliert, wodurch die Ergebnisse nicht die molekularen Verhältnisse in Podozyten direkt, sondern eher den des glomerulären Zellkonglomerats abbilden. Die p53-Abhängigkeit der hier beschriebenen Auswirkungen des Podozyten-spezifischen MDM2-Knockouts sollte des Weiteren durch einen Co-Knockout von p53 verifiziert werden. Dieser wurde im Anschluss an diese Arbeit im Rahmen einer anderen Dissertation durchgeführt, und bestätigten ebenso wie analoge Experimente in Zebrafärblingen (*Danio rerio*) sowie *in vitro* die hier beschriebenen Beobachtungen (siehe [205]).

5 Zusammenfassung

Ein Podozyten-spezifischer Knockout des p53-regulierenden Moleküls MDM2 führt bei Mäusen zu einem progredienten Verlust der Podozyten, der mit Proteinurie, Glomerulosklerose, und eingeschränkter Lebenserwartung der Versuchstiere einhergeht. Unsere Hypothese, dass MDM2 für das jahrzehntelange Überleben von Podozyten sowie ihre Widerstandsfähigkeit, und damit für die erfolgreiche Aufrechterhaltung der lebensnotwendigen glomerulären Filtrationsbarriere verantwortlich ist, konnte damit bestätigt werden. Allerdings scheint MDM2 in Podozyten, anders als beispielsweise in Kardiomyozyten oder Neuronen, während der embryonalen Entwicklung nicht essenziell zu sein; unseren Erkenntnissen nach kommt es zu regelrechter Ausbildung der Podozyten, und erst postnatal zu durch MDM2-Mangel bedingter Schädigung und Untergang derselbigen.

Wir konnten außerdem zeigen, dass die zuvor von Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe gestützte Vermutung, dass MDM2-Suppression auf stimulierte Podozyten eine protektive Wirkung, und MDM2-Antagonisten damit einen positiven Effekt auf den Progress von CKD haben könnten, sich nicht bestätigt. Sowohl auf stimulierte als auch auf umstimulierte Podozyten hat MDM2-Mangel einen schädigenden Einfluss, und wirkt damit eher beschleunigend auf den Progress einer CKD.

MDM2-Suppression ist ein vielversprechender Ansatz, da dadurch in verschiedenen Tumoren eine reaktive Steigerung der p53-Spiegel erreicht werden kann, wodurch sich eine Tumorregression erzielen lässt. Klinische Studien liefern Hinweise für einen Erfolg solcher Therapieverfahren, was auf eine in den kommenden Jahren steigende Relevanz von MDM2-Antagonisten im Rahmen von Chemotherapien hinweist. Unserer Studie konnte die Erkenntnis untermauern, dass MDM2-Suppressoren allerdings auch erhebliche Kollateralschäden in gesunden Geweben verursachen können. Ihr Einsatz sollte daher unter strenger Kontrolle, unter anderem der Nieren, erfolgen, und es sind möglichst geringe Dosierungen, beispielsweise im Rahmen von Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika, anzustreben.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
CA	Karzinom
CKD	chronic kidney disease
Cre	causes recombination
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	fetales Kälberserum
FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
GS	Glomerulosklerose
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFB	glomeruläre Filtrationsbarriere
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
KO	Knockout
LDH	Lactatdehydrogenase
MDM2	murine-double-Minute-2
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAS	Periodic Acid-Schiff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PEC	parietale Epithelzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TAE	Tris Acetate-EDTA Puffer
TLR	Toll-like Rezeptor
ZNS	zentrales Nervensystem

7 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Glomerulus-Querschnitt, schematische Darstellung</i>	9
<i>Abbildung 2: Podozytenverlust führt zu CKD</i>	12
<i>Abbildung 3: Podozyten Morphologie</i>	14
<i>Abbildung 4: Schematischer Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere</i>	18
<i>Abbildung 5: Regulation von p53 durch MDM2</i>	25
<i>Abbildung 6: Herstellung der MDM2^{ΔPodozyt}-Mäuse</i>	41
<i>Abbildung 7: Glomerulus-Isolation</i>	45
<i>Abbildung 8: MDM2 ist durch Knockout erfolgreich vermindert</i>	60
<i>Abbildung 9: Glomeruli, p53-gefärbt</i>	62
<i>Abbildung 10: Expression Podozyten-spezifischer Gene</i>	63
<i>Abbildung 11: Podozytenverlust in MDM2^{ΔPodozyt} Mäusen</i>	65
<i>Abbildung 12: Entwicklung Proteinurie in MDM2^{ΔPodozyt}-Mäusen</i>	67
<i>Abbildung 13: Histologie 8 und 14 Wochen alter Nieren</i>	68
<i>Abbildung 14: Entwicklung des Körpergewichts</i>	69
<i>Abbildung 15: Überleben von MDM2^{ΔPodozyt} Mäusen und Kontrolle</i>	70
<i>Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Podozyten</i>	72
<i>Abbildung 17: Murine Glomeruli, 1. Tag postnatal.</i>	73
<i>Abbildung 18: LDH-Assay nach Stimulation</i>	75
<i>Abbildung 19: Ausbreitung der Podozytenkolonien nach Stimulation</i>	76

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: MDM2-/p53-Mutationsraten</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2: MDM2 Inhibitoren in klinischen Studien</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 3: Phänotypen MDM2-genveränderter Mäuse</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 4: Kombinationstherapien mit MDM2-Antagonisten</i>	<i>87</i>

9 Bibliografie

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter., Suppl.* 2013; 3: 1-150.
2. Levey, A.S. and J. Coresh, *Chronic Kidney Disease*. *Lancet*, 2012. **379**(9811): p. 165-80.
3. U.S. Renal Data System, *USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States*, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013.
4. Metcalfe, W., How does early chronic kidney disease progress? A background paper prepared for the UK Consensus Conference on early chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. **22 Suppl 9**: p. ix26-30.
5. Eckardt, K.U., et al., Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*, 2013. **382**(9887): p. 158-69.
6. Coresh, J., et al., Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*, 2007. **298**(17): p. 2038-47.
7. Grindt, M., et al., The prevalence of renal failure- results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008 - 2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int*, 2016. **113**: p. 85-91.
8. Global Health Estimates: Deaths by Cause, Age, Sex and Country, 2000-2012. World Health Organization. Geneva, 2014.
9. Tonelli, M., et al., Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(7): p. 2034-47.
10. Rosner, M., E. Abdel-Rahman, and M.E. Williams, Geriatric nephrology: responding to a growing challenge. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010. **5**(5): p. 936-42.
11. Lysaght, M.J., Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13 Suppl 1**: p. S37-40.
12. Go, A.S., et al., Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
13. Mortality, G.B.D. and C. Causes of Death, Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2015. **385**(9963): p. 117-71.
14. Theodor Fahr, O.L., *Die Nierengewächse*. Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie, ed. O.L. Friedrich Henke. Vol. 1. 1925, Berlin: Springer.
15. Bertram, J.F., et al., Human nephron number: implications for health and disease. *Pediatr Nephrol*, 2011. **26**(9): p. 1529-33.
16. Ohyama, K., et al., Extracellular matrix phenotype of rat mesangial cells in culture. Biosynthesis of collagen types I, III, IV, and V and a low molecular weight

- collagenous component and their regulation by dexamethasone. J Lab Clin Med, 1990. **116**(2): p. 219-27.
17. Shutka, B.V., E.P. Mel'man, and L.E. Koval'chuk, [Reactive properties of the glomerular mesangial cells during extreme loading of the kidney]. Biull Eksp Biol Med, 1984. **97**(1): p. 95-8.
 18. Haraldsson, B., J. Nyström, and W.M. Deen, Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. Physiological Reviews, 2008. **88**(2): p. 451-487.
 19. Rhodin, J., Electron microscopy of the glomerular capillary wall. Exp Cell Res, 1955. **8**(3): p. 572-4.
 20. Shankland, S.J., H.J. Anders, and P. Romagnani, Glomerular parietal epithelial cells in kidney physiology, pathology, and repair. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013. **22**(3): p. 302-9.
 21. Matsusaka, T., et al., Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 1013-23.
 22. Wharram, B.L., et al., Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(10): p. 2941-52.
 23. Hostetter, T.H., J.L. Troy, and B.M. Brenner, Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. Kidney Int, 1981. **19**(3): p. 410-5.
 24. D'Agati, V.D., F.J. Kaskel, and R.J. Falk, *Focal Segmental Glomerulosclerosis*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(25): p. 2398-2411.
 25. Couser, W.G. and C.K. Abrass, Pathogenesis of membranous nephropathy. Annu Rev Med, 1988. **39**: p. 517-30.
 26. Bennett, W.M., W.L. Henrich, and J.S. Stoff, The renal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: summary and recommendations. Am J Kidney Dis, 1996. **28**(1 Suppl 1): p. S56-62.
 27. Ross, M.J. and P.E. Klotman, Recent progress in HIV-associated nephropathy. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(12): p. 2997-3004.
 28. Nagata, M. and W. Kriz, Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. Kidney Int, 1992. **42**(1): p. 148-60.
 29. Bhathena, D.B., Glomerular basement membrane length to podocyte ratio in human nephronopenia: implications for focal segmental glomerulosclerosis. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(6): p. 1179-88.
 30. Wiggins, J.E., et al., Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(10): p. 2953-66.
 31. Chen, H.M., et al., Podocyte lesions in patients with obesity-related glomerulopathy. Am J Kidney Dis, 2006. **48**(5): p. 772-9.
 32. Schiffer, M., et al., Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 807-16.

33. Petermann, A.T., et al., Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. *Kidney Int*, 2003. **64**(4): p. 1222-31.
34. Anderson, S., et al., Control of glomerular hypertension limits glomerular injury in rats with reduced renal mass. *J Clin Invest*, 1985. **76**(2): p. 612-9.
35. Kim, Y.H., et al., Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int*, 2001. **60**(3): p. 957-68.
36. Brenner, B.M., E.V. Lawler, and H.S. Mackenzie, The hyperfiltration theory: a paradigm shift in nephrology. *Kidney Int*, 1996. **49**(6): p. 1774-7.
37. Ichikawa, I., et al., Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005. **14**(3): p. 205-10.
38. Matsusaka, T., et al., Podocyte injury damages other podocytes. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(7): p. 1275-85.
39. Wiggins, R.C., The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int*, 2007. **71**(12): p. 1205-14.
40. Kriz, W., Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microsc Res Tech*, 2002. **57**(4): p. 189-95.
41. Greka, A. and P. Mundel, Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol*, 2012. **74**: p. 299-323.
42. Kriz, W., Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 1996. **11**(9): p. 1738-42.
43. Thomasova, D. and H.J. Anders, *Cell cycle control in the kidney*. *Nephrol Dial Transplant*, 2015. **30**(10): p. 1622-30.
44. Mundel, P. and W. Kriz, Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)*, 1995. **192**(5): p. 385-97.
45. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(1): p. 253-307.
46. Drenckhahn, D. and R.P. Franke, Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest*, 1988. **59**(5): p. 673-82.
47. Reiser, J., et al., The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(1): p. 1-8.
48. Mathieson, P.W., *Update on the podocyte*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009. **18**(3): p. 206-11.
49. Somlo, S. and P. Mundel, Getting a foothold in nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 2000. **24**(4): p. 333-5.
50. Kerjaschki, D., Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest*, 2001. **108**(11): p. 1583-7.
51. Benigni, A., et al., Inhibiting angiotensin-converting enzyme promotes renal repair by limiting progenitor cell proliferation and restoring the glomerular architecture. *Am J Pathol*, 2011. **179**(2): p. 628-38.

52. Pichaiwong, W., et al., Reversibility of structural and functional damage in a model of advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2013. **24**(7): p. 1088-102.
53. Zhang, J., et al., Podocyte repopulation by renal progenitor cells following glucocorticoids treatment in experimental FSGS. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **304**(11): p. F1375-89.
54. Shankland, S.J., J.W. Pippin, and J.S. Duffield, *Progenitor cells and podocyte regeneration*. *Semin Nephrol*, 2014. **34**(4): p. 418-28.
55. Eng, D.G., et al., Glomerular parietal epithelial cells contribute to adult podocyte regeneration in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 2015. **88**(5): p. 999-1012.
56. Wanner, N., et al., Unraveling the role of podocyte turnover in glomerular aging and injury. *J Am Soc Nephrol*, 2014. **25**(4): p. 707-16.
57. Lasagni, L., et al., Podocyte Regeneration Driven by Renal Progenitors Determines Glomerular Disease Remission and Can Be Pharmacologically Enhanced. *Stem Cell Reports*, 2015. **5**(2): p. 248-63.
58. Griffin, S.V., et al., Podocyte proliferation and differentiation in glomerular disease: role of cell-cycle regulatory proteins. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18 Suppl 6**: p. vi8-13.
59. Shankland, S.J., et al., Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int*, 2007. **72**(1): p. 26-36.
60. Saleem, M.A., et al., A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(3): p. 630-8.
61. Jat, P.S., et al., Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(12): p. 5096-100.
62. Friedrich, C., et al., Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. **291**(4): p. F856-65.
63. Reiser, J. and S. Sever, Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. *Annu Rev Med*, 2013. **64**: p. 357-66.
64. Jarad, G. and J.H. Miner, Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009. **18**(3): p. 226-32.
65. Bulger, R.E., et al., Endothelial characteristics of glomerular capillaries in normal, mercuric chloride-induced, and gentamicin-induced acute renal failure in the rat. *J Clin Invest*, 1983. **72**(1): p. 128-41.
66. Rippe, B. and B. Haraldsson, Transport of macromolecules across microvascular walls: the two-pore theory. *Physiol Rev*, 1994. **74**(1): p. 163-219.
67. Jarad, G., et al., Proteinuria precedes podocyte abnormalities in *Lamb2*^{-/-} mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier. *J Clin Invest*, 2006. **116**(8): p. 2272-9.
68. Farquhar, M.G., The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. *J Clin Invest*, 2006. **116**(8): p. 2090-3.
69. Miner, J.H., Organogenesis of the kidney glomerulus: focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis*, 2011. **7**(2): p. 75-82.

70. Rodewald, R. and M.J. Karnovsky, Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*, 1974. **60**(2): p. 423-33.
71. Chugh, S.S., B. Kaw, and Y.S. Kanwar, Molecular structure-function relationship in the slit diaphragm. *Semin Nephrol*, 2003. **23**(6): p. 544-55.
72. Daniels, B.S., et al., Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods. *J Clin Invest*, 1993. **92**(2): p. 929-36.
73. Linzer, D.I. and A.J. Levine, Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 1979. **17**(1): p. 43-52.
74. Linzer, D.I., W. Maltzman, and A.J. Levine, The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen. *Virology*, 1979. **98**(2): p. 308-18.
75. Baker, S.J., et al., Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 1989. **244**(4901): p. 217-21.
76. Nigro, J.M., et al., Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 1989. **342**(6250): p. 705-8.
77. Lane, D.P., Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
78. Vousden, K.H., *p53: death star*. *Cell*, 2000. **103**(5): p. 691-4.
79. Riley, T., et al., Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(5): p. 402-12.
80. Koshland, D.E., Jr., *Molecule of the year*. *Science*, 1993. **262**(5142): p. 1953.
81. Matlashewski, G., et al., Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J*, 1984. **3**(13): p. 3257-62.
82. Levine, A.J., p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 323-31.
83. Wu, X., et al., The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 1993. **7**(7A): p. 1126-32.
84. Oren, M., Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ*, 2003. **10**(4): p. 431-42.
85. Harris, S.L. and A.J. Levine, The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 2005. **24**(17): p. 2899-908.
86. Yee, K.S. and K.H. Vousden, Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis*, 2005. **26**(8): p. 1317-22.
87. Zhang, X.P., F. Liu, and W. Wang, Two-phase dynamics of p53 in the DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(22): p. 8990-5.
88. Reisman, D., et al., Transcriptional Regulation of the p53 Tumor Suppressor Gene in S-Phase of the Cell-Cycle and the Cellular Response to DNA Damage. *Biochem Res Int*, 2012. **2012**: p. 808934.
89. Fischer, M., et al., The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(1): p. 164-74.
90. Appella, E. and C.W. Anderson, Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(10): p. 2764-72.

91. Zilfou, J.T. and S.W. Lowe, *Tumor suppressive functions of p53*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(5): p. a001883.
92. Kruse, J.P. and W. Gu, *Modes of p53 regulation*. Cell, 2009. **137**(4): p. 609-22.
93. el-Deiry, W.S., et al., Definition of a consensus binding site for p53. Nat Genet, 1992. **1**(1): p. 45-9.
94. Barak, Y., et al., mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. EMBO J, 1993. **12**(2): p. 461-8.
95. Perry, M.E., et al., The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11623-7.
96. Liu, Y., et al., Facilitated search for specific genomic targets by p53 C-terminal basic DNA binding domain. Cancer Biol Ther, 2004. **3**(11): p. 1102-8.
97. Espinosa, J.M., R.E. Verdun, and B.M. Emerson, p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 1015-27.
98. Levine, A.J., et al., The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. Br J Cancer, 1994. **69**(3): p. 409-16.
99. Hainaut, P. and M. Hollstein, p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. Adv Cancer Res, 2000. **77**: p. 81-137.
100. Sigal, A. and V. Rotter, Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. Cancer Res, 2000. **60**(24): p. 6788-93.
101. Gao, J., et al., Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. Sci Signal, 2013. **6**(269): p. pl1.
102. Donehower, L.A., et al., Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-21.
103. Lozano, G. and G.P. Zambetti, What have animal models taught us about the p53 pathway? J Pathol, 2005. **205**(2): p. 206-20.
104. Iwakuma, T. and G. Lozano, Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models. Oncogene, 2007. **26**(15): p. 2177-84.
105. Bullock, A.N. and A.R. Fersht, *Rescuing the function of mutant p53*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 68-76.
106. Fojo, T., p53 as a therapeutic target: unresolved issues on the road to cancer therapy targeting mutant p53. Drug Resist Updat, 2002. **5**(5): p. 209-16.
107. Ventura, A., et al., Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. Nature, 2007. **445**(7128): p. 661-5.
108. Xue, W., et al., Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature, 2007. **445**(7128): p. 656-60.
109. Vassilev, L.T., MDM2 inhibitors for cancer therapy. Trends Mol Med, 2007. **13**(1): p. 23-31.
110. Cahilly-Snyder, L., et al., Molecular analysis and chromosomal mapping of amplified genes isolated from a transformed mouse 3T3 cell line. Somat Cell Mol Genet, 1987. **13**(3): p. 235-44.
111. Momand, J., et al., The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. Cell, 1992. **69**(7): p. 1237-45.

112. Haupt, Y., et al., Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 1997. **387**(6630): p. 296-9.
113. Kubbutat, M.H., S.N. Jones, and K.H. Vousden, *Regulation of p53 stability by Mdm2*. *Nature*, 1997. **387**(6630): p. 299-303.
114. Jones, S.N., et al., Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature*, 1995. **378**(6553): p. 206-8.
115. Montes de Oca Luna, R., D.S. Wagner, and G. Lozano, Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, 1995. **378**(6553): p. 203-6.
116. Honda, R., H. Tanaka, and H. Yasuda, Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters*, 1997. **420**(1): p. 25-27.
117. Li, M., et al., Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, 2003. **302**(5652): p. 1972-5.
118. Juven-Gershon, T. and M. Oren, *Mdm2: the ups and downs*. *Mol Med*, 1999. **5**(2): p. 71-83.
119. Marine, J.C. and G. Lozano, Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death Differ*, 2010. **17**(1): p. 93-102.
120. Freedman, D.A. and A.J. Levine, Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(12): p. 7288-93.
121. Roth, J., et al., Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J*, 1998. **17**(2): p. 554-64.
122. Yu, Z.K., R.K. Geyer, and C.G. Maki, MDM2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic P53. *Oncogene*, 2000. **19**(51): p. 5892-7.
123. Moll, U.M. and O. Petrenko, *The MDM2-p53 interaction*. *Mol Cancer Res*, 2003. **1**(14): p. 1001-8.
124. Laurie, N.A., et al., Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature*, 2006. **444**(7115): p. 61-6.
125. Chen, J., V. Marechal, and A.J. Levine, Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(7): p. 4107-14.
126. Thut, C.J., J.A. Goodrich, and R. Tjian, Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev*, 1997. **11**(15): p. 1974-86.
127. Grier, J.D., et al., Tissue-specific differences of p53 inhibition by Mdm2 and Mdm4. *Mol Cell Biol*, 2006. **26**(1): p. 192-8.
128. Oliner, J.D., et al., Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 1992. **358**(6381): p. 80-3.
129. Michael, D. and M. Oren, The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol*, 2003. **13**(1): p. 49-58.
130. Giglio, S., et al., Identification of an aberrantly spliced form of HDMX in human tumors: a new mechanism for HDM2 stabilization. *Cancer Res*, 2005. **65**(21): p. 9687-94.

131. Momand, J., et al., The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(15): p. 3453-9.
132. Freedman, D.A., L. Wu, and A.J. Levine, *Functions of the MDM2 oncoprotein*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **55**(1): p. 96-107.
133. Lundgren, K., et al., Targeted expression of MDM2 uncouples S phase from mitosis and inhibits mammary gland development independent of p53. *Genes Dev*, 1997. **11**(6): p. 714-25.
134. Jones, S.N., et al., Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15608-12.
135. Forslund, A., et al., MDM2 gene amplification is correlated to tumor progression but not to the presence of SNP309 or TP53 mutational status in primary colorectal cancers. *Mol Cancer Res*, 2008. **6**(2): p. 205-11.
136. Shibagaki, I., et al., p53 mutation, murine double minute 2 amplification, and human papillomavirus infection are frequently involved but not associated with each other in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 1995. **1**(7): p. 769-73.
137. Parant, J., et al., Rescue of embryonic lethality in Mdm4-null mice by loss of Trp53 suggests a nonoverlapping pathway with MDM2 to regulate p53. *Nat Genet*, 2001. **29**(1): p. 92-5.
138. Cancer Genome Atlas Research, N., Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*, 2008. **455**(7216): p. 1061-8.
139. Gilkes, D.M., et al., Regulation of MDMX expression by mitogenic signaling. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(6): p. 1999-2010.
140. Lam, S., et al., Role of Mdm4 in drug sensitivity of breast cancer cells. *Oncogene*, 2010. **29**(16): p. 2415-26.
141. Mejia-Guerrero, S., et al., Characterization of the 12q15 MDM2 and 12q13-14 CDK4 amplicons and clinical correlations in osteosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 2010. **49**(6): p. 518-25.
142. Ito, M., et al., Comprehensive mapping of p53 pathway alterations reveals an apparent role for both SNP309 and MDM2 amplification in sarcomagenesis. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(3): p. 416-26.
143. Gembarska, A., et al., MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat Med*, 2012. **18**(8): p. 1239-47.
144. Wade, M., Y.C. Li, and G.M. Wahl, MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(2): p. 83-96.
145. Kastan, M.B., Wild-type p53: tumors can't stand it. *Cell*, 2007. **128**(5): p. 837-40.
146. Mulay, S.R., et al., Podocyte loss involves MDM2-driven mitotic catastrophe. *J Pathol*, 2013. **230**(3): p. 322-35.
147. Shangary, S. and S. Wang, Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2009. **49**: p. 223-41.

148. Shangary, S., et al., Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(10): p. 3933-8.
149. Martins, C.P., L. Brown-Swigart, and G.I. Evan, Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell*, 2006. **127**(7): p. 1323-34.
150. Chen, L., et al., Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(1): p. 195-200.
151. Sun, Y., Targeting E3 ubiquitin ligases for cancer therapy. *Cancer Biol Ther*, 2003. **2**(6): p. 623-9.
152. Yang, Y., et al., Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell*, 2005. **7**(6): p. 547-59.
153. Arkin, M.R. and J.A. Wells, Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(4): p. 301-17.
154. Picksley, S.M., et al., Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene*, 1994. **9**(9): p. 2523-9.
155. Kussie, P.H., et al., Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, 1996. **274**(5289): p. 948-53.
156. Wasylyk, C., et al., p53 mediated death of cells overexpressing MDM2 by an inhibitor of MDM2 interaction with p53. *Oncogene*, 1999. **18**(11): p. 1921-34.
157. Chene, P., et al., A small synthetic peptide, which inhibits the p53-hdm2 interaction, stimulates the p53 pathway in tumour cell lines. *J Mol Biol*, 2000. **299**(1): p. 245-53.
158. Issaeva, N., et al., Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nat Med*, 2004. **10**(12): p. 1321-8.
159. Vassilev, L.T., et al., In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 2004. **303**(5659): p. 844-8.
160. Wiman, K.G., Strategies for therapeutic targeting of the p53 pathway in cancer. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(6): p. 921-6.
161. Secchiero, P., et al., Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3. *Curr Pharm Des*, 2011. **17**(6): p. 569-77.
162. Tovar, C., et al., Small-molecule MDM2 antagonists reveal aberrant p53 signaling in cancer: implications for therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(6): p. 1888-93.
163. Burgess, A., et al., Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies. *Front Oncol*, 2016. **6**: p. 7.
164. Mulay, S.R., et al., MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice. *Kidney Int*, 2012. **81**(12): p. 1199-211.
165. Imai, Y., et al., p53 mutations and MDM-2 amplification in renal cell cancers. *Mod Pathol*, 1994. **7**(7): p. 766-70.
166. Hilliard, S., et al., Tight regulation of p53 activity by Mdm2 is required for ureteric bud growth and branching. *Dev Biol*, 2011. **353**(2): p. 354-66.

167. Hilliard, S.A., X. Yao, and S.S. El-Dahr, Mdm2 is required for maintenance of the nephrogenic niche. *Dev Biol*, 2014. **387**(1): p. 1-14.
168. Mulay, S.R., et al., Murine Double Minute-2 Inhibition Ameliorates Established Crescentic Glomerulonephritis. *Am J Pathol*, 2016.
169. Allam, R., et al., Mdm2 promotes systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(11): p. 2016-27.
170. Hagemann, J.H., et al., Nrf2 signalling promotes ex vivo tubular epithelial cell survival and regeneration via murine double minute (MDM)-2. *Nephrol Dial Transplant*, 2013. **28**(8): p. 2028-37.
171. Mundel, P., J. Reiser, and W. Kriz, Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol*, 1997. **8**(5): p. 697-705.
172. Mundel, P., et al., Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol*, 1997. **139**(1): p. 193-204.
173. Tryggvason, K., Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 1999. **10**(11): p. 2440-5.
174. Su, J., et al., Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte marker. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010. **87**(2): p. 167-75.
175. Chavez-Reyes, A., et al., Switching mechanisms of cell death in mdm2- and mdm4-null mice by deletion of p53 downstream targets. *Cancer Res*, 2003. **63**(24): p. 8664-9.
176. Boesten, L.S., et al., Mdm2, but not Mdm4, protects terminally differentiated smooth muscle cells from p53-mediated caspase-3-independent cell death. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(12): p. 2089-98.
177. Jaramillo-Rangel, G., et al., p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog regulates p53 in vivo in the adult mouse eye lens. *Mol Vis*, 2013. **19**: p. 2468-76.
178. Valentin-Vega, Y.A., H. Okano, and G. Lozano, The intestinal epithelium compensates for p53-mediated cell death and guarantees organismal survival. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(11): p. 1772-81.
179. Liu, G., et al., The p53-Mdm2 network in progenitor cell expansion during mouse postnatal development. *J Pathol*, 2007. **213**(4): p. 360-8.
180. Xiong, S., et al., Synergistic roles of Mdm2 and Mdm4 for p53 inhibition in central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(9): p. 3226-31.
181. Lengner, C.J., et al., Osteoblast differentiation and skeletal development are regulated by Mdm2-p53 signaling. *J Cell Biol*, 2006. **172**(6): p. 909-21.
182. Wade, M., Y.V. Wang, and G.M. Wahl, The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol*, 2010. **20**(5): p. 299-309.
183. Kodama, T., et al., Increases in p53 expression induce CTGF synthesis by mouse and human hepatocytes and result in liver fibrosis in mice. *J Clin Invest*, 2011. **121**(8): p. 3343-56.
184. Xiong, S., Mouse models of Mdm2 and Mdm4 and their clinical implications. *Chin J Cancer*, 2013. **32**(7): p. 371-5.

185. Boute, N., et al., NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 2000. **24**(4): p. 349-54.
186. FP, W. and B. GJ, Comparative Placentation. Structures, functions and evolution. Berlin (Germany): Springer; 2008.
187. Marine, J.C. and A.G. Jochemsen, Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **331**(3): p. 750-60.
188. Lasagni, L., et al., Podocyte mitosis - a catastrophe. *Curr Mol Med*, 2013. **13**(1): p. 13-23.
189. Castedo, M., et al., Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2825-37.
190. Shankland, S.J., The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 2006. **69**(12): p. 2131-2147.
191. Chen, J., et al., A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 2012. **488**(7412): p. 522-6.
192. Francoz, S., et al., Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(9): p. 3232-7.
193. Kawai, H., D. Wiederschain, and Z.M. Yuan, Critical contribution of the MDM2 acidic domain to p53 ubiquitination. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(14): p. 4939-47.
194. Feki, A. and I. Irminger-Finger, Mutational spectrum of p53 mutations in primary breast and ovarian tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. **52**(2): p. 103-16.
195. Thompson, T., et al., Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem*, 2004. **279**(51): p. 53015-22.
196. Binder, B.R., A novel application for murine double minute 2 antagonists: the p53 tumor suppressor network also controls angiogenesis. *Circ Res*, 2007. **100**(1): p. 13-4.
197. Secchiero, P., et al., Antiangiogenic activity of the MDM2 antagonist nutlin-3. *Circ Res*, 2007. **100**(1): p. 61-9.
198. Ray-Coquard, I., et al., Effect of the MDM2 antagonist RG7112 on the P53 pathway in patients with MDM2-amplified, well-differentiated or dedifferentiated liposarcoma: an exploratory proof-of-mechanism study. *Lancet Oncol*, 2012. **13**(11): p. 1133-40.
199. Andreeff, M., et al., Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia. *Clin Cancer Res*, 2016. **22**(4): p. 868-76.
200. Aziz, M.H., H. Shen, and C.G. Maki, Acquisition of p53 mutations in response to the non-genotoxic p53 activator Nutlin-3. *Oncogene*, 2011. **30**(46): p. 4678-86.
201. Ringshausen, I., et al., Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell*, 2006. **10**(6): p. 501-14.
202. Carrick, S., et al., Single agent versus combination chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2009(2): p. CD003372.
203. Chawla, S., et al., *Phase Ib study of RG7112 with doxorubicin (D) in advanced soft tissue sarcoma (ASTS)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013 ASCO Annual Meeting Abstracts. Vol 31, No 15_suppl (May 20 Supplement), 2013: 10514.

204. Yee, K., et al., Phase 1b Study Of The MDM2 Antagonist RG7112 In Combination With 2 Doses/Schedules Of Cytarabine. *Blood* Nov 2013, 122 (21) 498.
205. Thomasova, D., et al., Murine Double Minute-2 Prevents p53-Overactivation-Related Cell Death (Podoptosis) of Podocytes. *J Am Soc Nephrol*, 2015. **26**(7): p. 1513-23.
206. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Geneva, World Health Organization, 2012.

10 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans Joachim Anders und meiner Betreuerin Dr. Dana Thomasova, PhD, für die exzellente und umfassende Betreuung bei der Durchführung dieser Dissertation. Sie leisteten die Vorarbeit, gaben den gedanklichen Anstoß, und trugen durch ihre fachliche und technische Expertise und Erfahrung in großem Maße zur Realisierung dieses Projektes bei. Ein weiterer großer Dank geht an das restliche Team der Arbeitsgruppe Anders. Ihre kollegiale Art und die bemerkenswerte Hilfsbereitschaft haben mir besonders bei der Einarbeitung und dem Erlernen der Methodik sehr geholfen. Meine Mitdoktoranden Georg Lorenz, Ingo Hartter und Roman Günther haben stets für gute Stimmung im und um das Labor herum gesorgt. Mein Dank gilt auch Heni Eka Susanti und PD. Dr. hum. biol. Maciej Lech, die bei verschiedensten Problemen immer eine Lösung parat hatten. Dan Draganovici und Janina Mandelbaum danke ich für die Anfertigung der histologischen Schnitte sowie die Genotypisierung der Mäuse, und Prof. Dr. Helen Liapis (Washington University, St. Louis, Missouri, USA) für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Förderprogramms Forschung und Lehre der Medizinischen Fakultät der LMU München gefördert.